

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Genética



TESIS DOCTORAL

**Estudio clínico epidemiológico de las alteraciones cromosómicas
estructurales como causa de anomalías congénitas humanas**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

María Luisa Martínez Fernández

Director
Francisco Javier Gallego Rodríguez

Madrid, 2016

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

**ESTUDIO CLÍNICO Y EPIDEMIOLÓGICO DE LAS
ALTERACIONES CROMOSÓMICAS ESTRUCTURALES
COMO CAUSA DE ANOMALÍAS CONGÉNITAS HUMANAS**

TESIS DOCTORAL

M^aLUISA MARTÍNEZ FERNÁNDEZ
MADRID, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

**ESTUDIO CLÍNICO Y EPIDEMIOLOGICO DE LAS
ALTERACIONES CROMOSÓMICAS ESTRUCTURALES
COMO CAUSA DE ANOMALÍAS CONGÉNITAS HUMANAS**

Directora de tesis: Dra. M^aLuisa Martínez-Frías

Tutor: Dr. Francisco Javier Gallego Rodríguez

**Memoria presentada por M^aLuisa Martínez Fernández
para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas.**

Este trabajo ha sido realizado en el laboratorio del Estudio Colaborativo Español de Malformaciones Congénitas (ECEMC), localizado en el Centro de Investigación sobre Anomalías Congénitas (CIAC) del Instituto de Salud Carlos III de Madrid, Ministerio de Economía y Competitividad.

**A mis padres,
a madrina,
a David y
a mis dos tesoros.**

AGRADECIMIENTOS

Pensé que nunca llegaría este momento, pero gracias al empeño, empuje y ánimo de mucha gente que por suerte me rodea, he podido acabar escribiendo esta página.

La primera persona a la que le debo esta tesis doctoral es a M^aLuisa Martínez-Frías, sin ella esto no hubiera sido posible. Ella me inició en el maravilloso (y duro) mundo de los defectos congénitos cuando yo aún no había terminado la carrera de biológicas. Cuando cursaba 2º, me invitó a su laboratorio de citogenética para que aprendiera a “reconocer cromosomas” (como ella decía) y...ya me enganchó... Desde entonces estoy con ella, aprendiendo cada día a trabajar con esfuerzo, con tesón, con perseverancia y con mucho, mucho entusiasmo. M^aLuisa, eres un gran ejemplo para mí. Gracias por TODO.

Otras personas también muy importantes sin las que este trabajo no hubiera existido, son los médicos participantes en el ECEMC que colaboran de manera altruista con el envío de muestras y datos de los recién nacidos con defectos congénitos, desde hospitales de toda España. Y por supuesto, a las familias de estos niños que gracias a su colaboración en el estudio, ayudan a que otros niños nazcan sanos.

A mis compañeras del laboratorio: Alex, Azahara, Cristina y M^aJosé que han vivido de primera mano la elaboración de esta tesis y me han animado y ayudado cada día a conseguirlo.

A Mariano, que ha estado todos estos años ayudándome con la base de datos del ECEMC y siempre me sacaba una sonrisa con sus bromas...

A Eva, por su apoyo, sus mensajes, sus consejos, sus correcciones... Gracias por el empujón final.

A mis compañeras del Grupo Coordinador, porque son parte de este trabajo.

A mis excompañeras de laboratorio, sobre todo a mi querida Fermina de la que tanto aprendí en muy poco tiempo. Siempre seré tu pequeño saltamontes.

Al CIBERER, al Ministerio de Sanidad, al Ministerio de Economía y Competitividad, a las Consejerías de Sanidad de las Comunidades Autónomas y a la Fundación 1000 sobre defectos congénitos.

Al profesor Javier Gallego, que me lo puso todo muy fácil y aceptó ser mi tutor sin dudar. Cuando estaba a punto de tirar la toalla, me dio el empujón que necesitaba para poder terminar este trabajo que tantos años llevaba haciendo. Ojala todos los profesores fueran así. Gracias Javier.

A mis padres, porque siempre me dieron lo mejor y siempre están ahí.

A mis hermanos, por su aliento, por confiar en mí.

A mis dos tesoros, que comprendieron que tenía que acabar este “trabajo importante”.

Y por último a David, por su apoyo, paciencia, ánimo, ayuda... y por enseñarme a relativizar las cosas.

INDICE

RESUMEN.....	I
1.- INTRODUCCIÓN.....	2
1.1- Evolución de las técnicas de bandeo cromosómico.....	5
1.2- Tipos de alteraciones cromosómicas estructurales.....	8
1.3- Desarrollo de las técnicas moleculares.....	10
1.3.1- Fluorescence in situ hybridization.....	10
1.3.2- Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA).....	12
1.3.3- Array-based Comparative Genomic Hybridization (array CGH).....	13
1.4- Descripción del Estudio Colaborativo Español de Malformaciones Congénitas (ECEMC).....	15
2- OBJETIVOS.....	22
3.- PUBLICACIONES.....	24
3.1- Publicaciones en revistas extranjeras.....	24
3.2- Publicaciones en revistas españolas.....	27
3.3- Publicaciones seleccionadas para esta tesis.....	31
4.- DISCUSION.....	84
5.- CONCLUSIONES.....	98
6.- SUMMARY.....	101
7.- BIBLIOGRAFÍA.....	106

RESUMEN

Los defectos congénitos de cualquier tipo se presentan alrededor del 2-3% de los niños recién nacidos. Sin embargo, si el periodo de detección de los defectos congénitos se amplía hasta los primeros años de vida, la proporción de niños afectados llega al 6-7%, dependiendo de los años de seguimiento que se incluyan para el cálculo. Estas frecuencias representan el riesgo poblacional (o basal) de los seres humanos; es decir, el riesgo que tienen todas las parejas de la población en cada embarazo, de que su hijo presente alteraciones del desarrollo prenatal.

Una de las causas conocidas de los defectos congénitos son las alteraciones cromosómicas que pueden ser de dos tipos: alteraciones numéricas (que afectan al número de cromosomas) y alteraciones estructurales (que afectan a la estructura). Las numéricas son más frecuentes que las estructurales, por ser más fácil su identificación, y por tanto, son más conocidas. Las alteraciones estructurales son más difíciles de detectar porque va a depender del tamaño de la alteración y la capacidad de detección de las técnicas disponibles. El cariotipo de alta resolución (550-850 bandas) puede detectar alteraciones estructurales que implican alrededor de 4 megabases (Mb) de ADN. Sin embargo, con el espectacular desarrollo de la citogenética molecular, fundamentalmente con el desarrollo de la hibridación genómica comparada (CGH, del inglés: *Comparative Genomic Hybridization*), se está produciendo un incremento exponencial en la identificación de alteraciones estructurales, de tamaños que se miden incluso en pares de bases. La CGH permite la detección de las pérdidas o ganancias de material genómico, y ha identificado la causa genética en un gran número de pacientes con trastornos del desarrollo neurológico y / o malformaciones congénitas.

Los datos utilizados para este trabajo proceden del Estudio Colaborativo Español de Malformaciones Congénitas (ECEMC). El ECEMC está basado en un sistema permanente de registro de niños recién nacidos con defectos congénitos, de tipo caso-control y base hospitalaria, cuya cobertura se sitúa alrededor del 20% de los

nacimientos en España. Es un sistema dinámico de registro y análisis de datos sobre recién nacidos, y mediante la comparación de los datos de los casos y los controles, se pueden inferir relaciones causales entre determinados factores y variables y defectos específicos.

Los objetivos concretos de este trabajo son:

1. Investigar la causa genética de los defectos congénitos en una serie consecutiva (no seleccionada) de niños recién nacidos.
2. Determinar cuáles son las alteraciones cromosómicas estructurales más frecuentes, en una muestra grande de niños recién nacidos consecutivos con defectos congénitos de cualquier tipo, identificados durante los últimos 30 años (desde el momento en que se creó el laboratorio del ECEMC).
3. Formar grupos homogéneos de pacientes que tengan las mismas alteraciones cromosómicas estructurales.
4. Establecer correlaciones genotipo-fenotipo en algunos grupos de alteraciones estructurales de los cromosomas.
5. Trasladar los resultados de la investigación sobre defectos congénitos a la práctica clínica.

Los resultados de este estudio se muestran en esta tesis doctoral con seis publicaciones.

En la primera publicación se ha estimado la frecuencia de alteraciones cromosómicas desbalanceadas estructurales identificados en la serie consecutiva de los recién nacidos con defectos congénitos entre los años 1981-2009, que se analizaron en el laboratorio del ECEMC mediante cariotipo de alta resolución (550-850 bandas), FISH y/o MLPA. Los resultados mostraron que las deleciones eran más frecuentes que las duplicaciones y que la microdelección 22q11.2 es la más común (38,46% de los casos), seguido por la microdelección de los cromosomas: 15 (15,38%) y 4 (10,26%). No se ha encontrado ninguna publicación sobre la frecuencia de alteraciones cromosómicas analizadas en series consecutivas de recién nacidos con

defectos congénitos, o sobre otros tipos de series no sesgadas, que analicen las alteraciones para cada cromosoma. No obstante, esto no es extraño, ya que no es fácil estudiar una población no sesgada y suficientemente grande, para detectar alteraciones cromosómicas que son muy poco frecuentes.

En la segunda publicación, se analizaron las regiones subteloméricas de todos los cromosomas mediante FISH, a 71 recién nacidos con defectos congénitos, con cariotipo normal y sin una sospecha clínica clara de ningún síndrome conocido. El resultado fue que el 9,86% presentó una alteración subtelomérica de uno o varios cromosomas, que justificaba los defectos congénitos del niño.

Los síndromes de microdelección o de genes contiguos son un grupo de desórdenes clínicamente reconocibles caracterizados por una microdelección (< 5Mb) de un cromosoma que abarca múltiples genes, y cuya haploinsuficiencia contribuye de manera independiente al fenotipo. Se han establecidos regiones mínimas de delección que producen un síndrome en concreto, que es la llamada región crítica. Un ejemplo de este tipo de síndromes es el síndrome de Wolf-Hirschhorn (WHS) cuya región crítica se localiza en el cromosoma 4 en la banda p16.3. La tercera publicación que aportó, se hizo en colaboración con la Dra. Zollino de Italia, en la que se describe un paciente con una delección en 4p16.3, de 1,9 Mb de tamaño, que apoyaba la propuesta de Zollino *et al.* [2003] de una nueva región crítica WHSCR-2 más distal que la región crítica previamente descrita.

En los últimos años, la CGH ha permitido identificar la causa en un gran número de pacientes con alteraciones del neurodesarrollo y/o malformaciones congénitas. Gracias a esta técnica detectamos una delección en un cromosoma 14 en una familia con el síndrome de Frías que describimos hace años clínicamente, y propusimos, en la cuarta publicación de esta memoria, la haploinsuficiencia del gen *BMP4* como el responsable del síndrome.

Además se ha descrito la delección más pequeña hasta el momento, en el síndrome de microdelección 17q22, desde su reciente identificación por Laurell *et al.* [2013], en la quinta publicación, y que ha permitido delimitar su región crítica.

Por último, hemos desarrollado un sistema de codificación alfa numérico altamente específico que nos permite definir cada alteración cromosómica estructural: por cromosoma, por brazo cromosómico, por origen...etc. Este sistema de codificación es de gran valor en la actualidad debido al gran aumento del diagnóstico de deleciones y duplicaciones gracias a las técnicas moleculares, para el que debemos estar preparados en los sistemas de registro de pacientes.

INTRODUCCIÓN

1.- INTRODUCCIÓN

Los términos “defectos y anomalías congénitas” se refieren a cualquier tipo de alteración que se produce durante el desarrollo prenatal. Sin embargo, cuando hablamos de “malformaciones” nos referimos a un tipo particular: las alteraciones del desarrollo morfológico que, por tanto, son alteraciones físicas. Estos matices, no son sólo semánticos, sino que permiten diferenciar los diversos procesos del desarrollo por los que se produce cada defecto o anomalía congénita.

Hoy día está plenamente establecido que alrededor del 2-3% de los niños recién nacidos (RN) presentan defectos congénitos de cualquier tipo. Sin embargo, si el periodo de detección de los defectos congénitos se amplía hasta los primeros años de vida, la proporción de niños afectados llega al 6-7% o más, dependiendo de los años de seguimiento que se incluyan para el cálculo. Estas frecuencias representan el riesgo poblacional (o basal) de los seres humanos; es decir, el riesgo que tienen todas las parejas de la población en cada embarazo, de que su hijo presente alteraciones del desarrollo prenatal. Sin embargo, el impacto socio-sanitario de los defectos congénitos, varía entre los diferentes países en función de su desarrollo. Así, está ampliamente documentado que en los países desarrollados son la primera causa de mortalidad y morbilidad infantil.

Los defectos congénitos se clasifican frecuentemente en función del tipo de patrón clínico en el que se presentan [Martínez-Frías y cols., 2012], y ello permite distinguir tres tipos de niños:

- Con defectos Aislados: son niños que presentan un solo defecto congénito.
- Polimalformados: son niños que presentan varios defectos congénitos afectando a sistemas u órganos distintos, que no se corresponden con algún síndrome conocido o algún tipo de causa identificada.

- **Síndromes:** son niños con diferentes defectos congénitos cuya causa común se conoce, o se sospecha, que es debida a una alteración genética, de cualquier tipo. En algunos niños el diagnóstico es solo clínico y se basa en la semejanza clínica entre los pacientes afectados. En otros casos, el diagnóstico es de certeza, por haber pruebas biológicas objetivas que lo documentan. Aunque no son exactamente síndromes, en este agrupamiento global, se incluyen también los casos con las llamadas embriofetopatías, cuya causa es ambiental.
- **Secundarios:** se refiere a aquellos defectos que, en realidad, no son alteraciones primarias (o intrínsecas) del desarrollo de la estructura de que se trate, sino que se producen como consecuencia de la presencia de otro defecto, que sería la auténtica alteración primaria del desarrollo. Por ejemplo, la ausencia de partes de las extremidades como consecuencia de una alteración vascular que impidió un flujo sanguíneo adecuado, dando lugar a la atrofia y amputación de la parte distal.

Las frecuencias de los distintos tipos de defectos, y conjuntos de defectos, son muy, muy pequeñas, lo que dificulta disponer de grupos homogéneos de pacientes con la misma alteración, o las mismas manifestaciones clínicas, para identificar sus causas.

En cuanto a la etiología de los defectos congénitos en recién nacidos, se distinguen los siguientes grupos (Cuadro 1):

- a) Causa genética
- b) Causa ambiental
- c) Causa multifactorial
- d) Causa desconocida

Cuadro 1. Grupos de causas de los defectos congénitos [Martínez-Frías y cols. 2012]

Cromosómica: Incluye todos los síndromes producidos por cualquier tipo de alteración de los cromosomas, sea en el número de ellos o en su estructura.

Génica: Incluye varios tipos de síndromes y defectos aislados debidos a alteraciones genéticas circunscritas a un gen:

1. Los que se deben a mutaciones de un solo gen (autosómicos dominantes, autosómicos recesivos y ligados al cromosoma X).
2. Los que se consideran genéticos pero no se ha definido aún el modelo de herencia.
3. Los debidos a alteraciones mayores del genoma que no son visibles en estudios citogenéticos de alta resolución y requieren técnicas moleculares (alteración del *imprinting*, y disomía uniparental).

Ambiental (Embríofetopatías): Incluye los defectos congénitos producidos por factores ambientales que llegan al embrión y feto a través de la madre, y alteran su desarrollo. Se les ha llamado también “síndromes ambientales”, pero en este contexto la palabra “síndrome” no es del todo correcta.

Multifactorial: Generalmente se refiere a defectos de presentación aislada (espina bífida, luxación de cadera, cardiopatía congénita, etc), que se producen por interacción entre una serie de genes y diversos factores ambientales.

Causa desconocida: En la actualidad, hasta un 60% de los RN con defectos congénitos no se pueden encuadrar en alguno de los apartados anteriores, por lo que se consideran de causa desconocida. Sin embargo, dentro de este grupo de niños se pueden distinguir al menos varios subgrupos:

1. Niños con defectos congénitos que muestran tanta semejanza en sus manifestaciones clínicas, que permiten su reconocimiento dentro del grupo, por lo que se les ha considerado como síndromes clínicos, aunque se desconoce su causa.
2. Niños con defectos congénitos que son diferentes entre sí, y en los que no se ha reconocido la causa o un tipo de manifestación clínica homogénea.
3. Niños con defectos congénitos aislados, cuya causa se desconoce.

Cuadro 1. Grupos de causas de los defectos congénitos [Martínez-Frías y cols. 2012]

En cuanto a las causas cromosómicas, que es en lo que está centrada esta Memoria, constituyen la principal causa conocida de los defectos congénitos. Existen dos tipos: alteraciones numéricas (que afectan al número de cromosomas) y alteraciones estructurales (que afectan a la estructura). Las numéricas son más frecuentes que las estructurales, por ser más fácil su identificación, y por tanto, son más conocidas. Sin embargo, en la medida en que han ido aumentando las posibilidades tecnológicas e incrementando la resolución de las bandas cromosómicas hasta alcanzar las 850 bandas, se ha ido aumentando la identificación de alteraciones

estructurales cada vez más pequeñas. En la actualidad, con el espectacular desarrollo de la citogenética molecular, fundamentalmente con el desarrollo de la hibridación genómica comparada (CGH, del inglés: *Comparative Genomic Hybridization*), se está produciendo un incremento exponencial en la identificación de alteraciones estructurales, de tamaños que se miden incluso en pares de bases. Estas alteraciones pueden ser pérdidas o ganancias de ADN que pueden ocurrir en un solo cromosoma o afectar a varios. A pesar de todo, esa detección no siempre es fácil de interpretar, y menos aún por los profesionales de diferentes áreas de la Medicina (menos ligadas al campo de la Genética).

1.1- Evolución de las técnicas de bandeo cromosómico

La identificación de alteraciones estructurales de los cromosomas como causa de patologías humanas, se inició realmente con el descubrimiento de las técnicas de bandeo cromosómico. A mediados de los años 50, Joe Hin Tjio (que trabajaba en la Estación Experimental de Aula Dei, en Zaragoza, España) y Albert Levan (en el Cancer Chromosome Laboratory, Institute of Genetics de Lund, Suecia) establecen el número y la estructura de los cromosomas humanos. Desde ese momento, las técnicas para la caracterización del cariotipo humano inician un continuo desarrollo en cuanto a su poder de resolución y eficacia. En la Figura 1 se muestran los tipos de tinciones citogenéticas que se han ido aplicando a lo largo del tiempo para el estudio de los cromosomas humanos hasta la actualidad. Así en la Figura 1a, se muestra la primera técnica citogenética de tinción completa con Giemsa, con la que se teñían de manera homogénea y sólo se podían detectar algunas alteraciones estructurales grandes, que suponían la pérdida o ganancia de gran parte o todo el brazo de algún cromosoma. De hecho, las alteraciones estructurales que con mayor frecuencia se detectaban eran las deleciones de prácticamente todo el brazo corto de los cromosomas 4 y 5 [Hirschhorn y cols., 1965; Wolf y cols., 1965, Lejeune y cols., 1963].

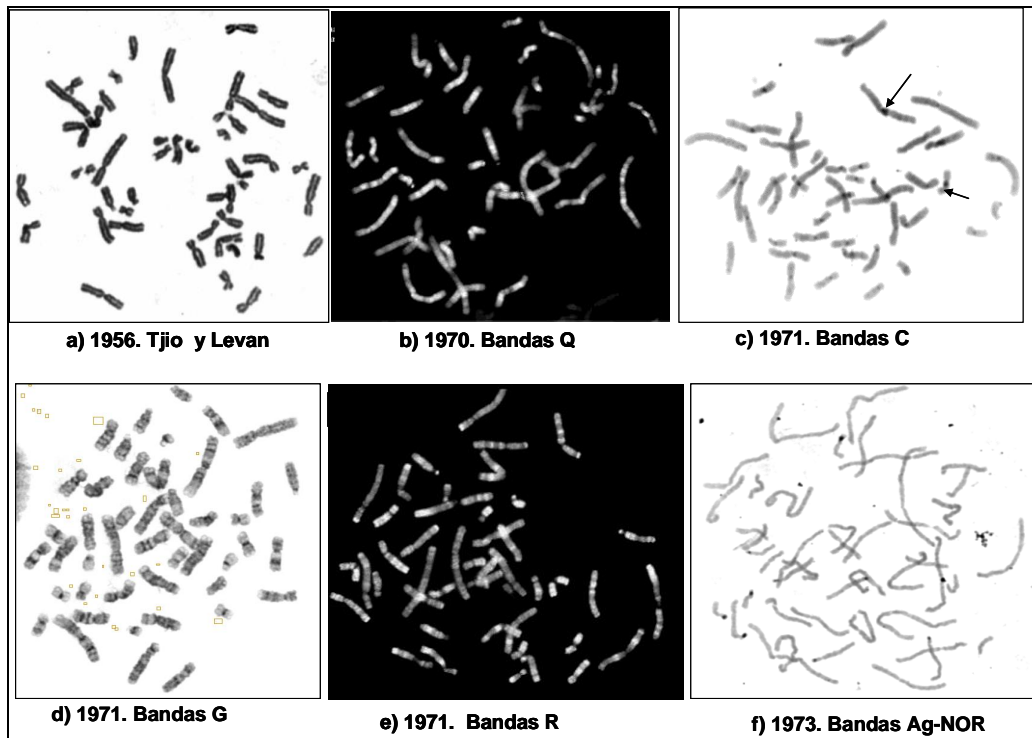


Figura 1: Tipos de tinciones de los cromosomas a lo largo del tiempo

Fue en 1970 cuando Caspersson y cols., aplicaron a los cromosomas humanos una técnica ya utilizada en células vegetales, que consistía en usar Mostaza de Quinacrina, que tiñe los cromosomas con un patrón de bandas claras y oscuras (**bandas Q**), específicas para cada pareja de cromosomas homólogos y diferentes entre las 23 parejas (Figura 1b). Otra técnica que se describió en 1971 por Arrighi y Hsu, fue la de las **bandas C**, que tiñen la heterocromatina centromérica (Figura 1c). Estas bandas se obtienen en los cromosomas tras ciertos tratamientos que desnaturalizan el ADN, seguidos de tinción con Giemsa, con lo cual se obtiene una intensa coloración en la región centromérica. Esta tinción se debe a la existencia de un ADN satélite en esa región, que está compuesta por secuencias repetitivas de nucleótidos y que se renaturalizan rápidamente. Sin embargo, el desarrollo de nuevas técnicas continuó y en 1973 se presentó una nueva técnica basada en la digestión de los cromosomas con Tripsina (enzima proteolítica) y posterior tinción con Giemsa, similar al patrón de bandas Q e invertidas con respecto al patrón de bandas R. Cada par de cromosomas se tiñe con un patrón distintivo de bandas claras y oscuras. Las bandas oscuras se llamaron **bandas G** (Figura 1d) y ofrecían una mayor resolución que incluía alrededor de 400 bandas entre los 46 cromosomas, permitiendo detectar pérdidas, ganancias y

translocaciones de menor tamaño. En el mismo año, Dutrillaux y Lejeune (1971), desarrollaron las **bandas R** (bandas *reverse*, Figura 1e), cuyo patrón de bandas es invertido con respecto al de las bandas Q y se obtienen gracias a un pretratamiento con calor y tinción con Giemsa. Por último, en 1973, Matsui y Sasaki, desarrollaron una técnica que requería Nitrato de Plata y mediante la cual se obtienen las **bandas Ag-NOR**, que sirven para visualizar las regiones organizadoras nucleolares (NOR, de sus siglas en inglés) de los cromosomas acrocéntricos, representadas en la Figura 1f.

En 1976, Yunis redujo el tiempo de exposición de las células a la colchicina (fármaco antimitótico que inhibe la división celular en metafase) y consiguió cromosomas más largos y, por tanto con más bandas, por estar en prometafase.

Posteriormente, Misawa y cols. (1986) utilizaron el bromuro de etidio como agente intercalador del ADN en la técnica para la obtención de cromosomas prometafásicos más largos. Al estar menos condensados se conseguía aumentar el número de bandas llegando incluso a las 850 (Figura 2). De esta forma, se ha conseguido ir detectando progresivamente más alteraciones y de tamaños mucho menores. De hecho, con la resolución actual se llegan a detectar tamaños de alteración que se sitúan alrededor de 4 megabases (Mb). Sin embargo, las diferencias del tamaño de las detecciones con bandas de alta resolución, se relaciona tanto con la localización de la delección, como con la experiencia en la identificación de alteraciones en cromosomas de 850 bandas. Además, con esta resolución de bandas se obtiene una mejor aproximación de los puntos de rotura (en relación con las bandas implicadas) de los cromosomas que están involucrados en dichas alteraciones.

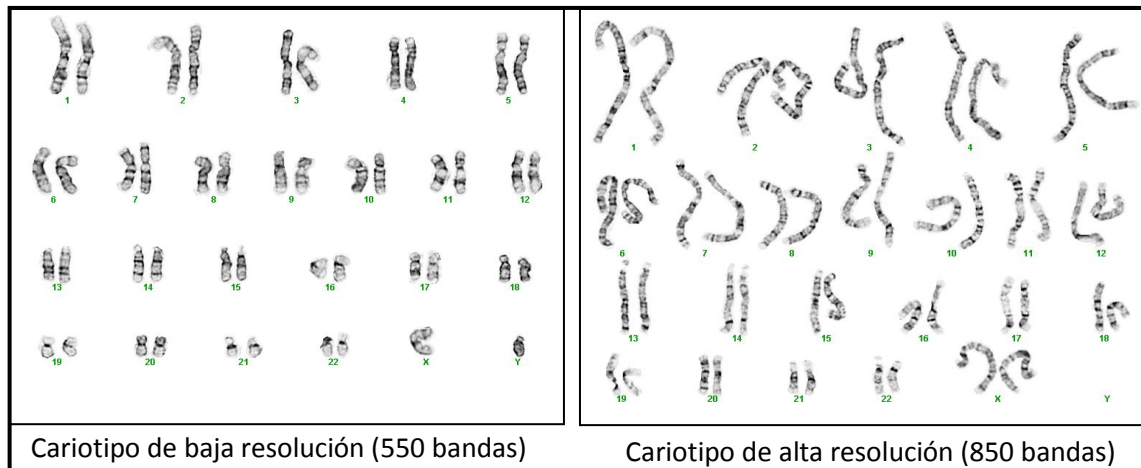


Figura 2: Evolución de la resolución del bandeo cromosómico en los cariotipos

La utilización de la técnica de bandas G de alta resolución significó un considerable progreso para la detección de alteraciones estructurales de tamaños pequeños en los seres humanos.

1.2- Tipos de alteraciones cromosómicas estructurales.

La estructura de los cromosomas puede alterarse por distintos mecanismos y pueden producirse alteraciones de dos tipos: *balanceadas*, cuando se ha producido una alteración pero no ha afectado a la cantidad de material cromosómico, y *desbalanceadas*, cuando la alteración produce pérdida o ganancia de material cromosómico. Estas alteraciones pueden ocurrir en un solo cromosoma, o afectar a dos o más. Los tipos clásicos de alteraciones se indican en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Tipos clásicos de alteraciones estructurales

Anomalías balanceadas: No hay pérdida ni ganancia de material genético. Por lo general no tienen repercusión fenotípica. Pueden ser de tres tipos:

1. **Translocaciones recíprocas:** son intercambios de fragmentos entre dos cromosomas no homólogos.
2. **Translocaciones Robertsonianas:** ocurren entre los cromosomas acrocéntricos (13, 14, 15, 21 ó 22) por unión entre sus centrómeros.
3. **Inversiones:** se producen la rotura por dos puntos en un cromosoma y se invierte el fragmento dentro del mismo cromosoma. Pueden ser *paracéntricas* si en el fragmento invertido no está incluido el centrómero, o *pericéntricas* si la inversión afecta a ambos brazos del cromosoma y el centrómero está incluido.

Anomalías desbalanceadas: Este tipo de alteraciones implica siempre ganancia o pérdida de material genético. Se clasifican en:

- a) **Deleciones:** pérdida de un fragmento de cromosoma, que puede ser terminal o intersticial, por lo que los individuos portadores son monosómicos para un gran número de genes. Las características clínicas dependen del tamaño de la deleción y de los genes implicados.
- b) **Duplicaciones:** presencia de material cromosómico extra que se ha duplicado. Su identificación ha sido mucho más difícil que las deleciones.
- c) **Inserciones:** un fragmento de un cromosoma se inserta en otro cromosoma no homólogo.
- d) **Cromosomas en anillo:** Pérdida de zonas terminales que se unen formando una figura circular (anillo).
- e) **Isocromosomas:** cromosomas que pierden un brazo completo y el que queda se duplica, por lo que da lugar a un cromosoma con dos brazos idénticos.
- f) **Cromosomas marcadores:** cromosomas de pequeño tamaño que no se pueden identificar con las técnicas convencionales de bandeo y requieren de técnicas moleculares.

Cuadro 2. Tipos clásicos de alteraciones estructurales

No existen muchos trabajos que puedan ofrecer la frecuencia de cada tipo de alteración estructural de los cromosomas. Hay algunos trabajos realizados sobre resultados de diagnóstico prenatal, pero las frecuencias que ofrecen tienen el sesgo de la causa por la que se realizó dicho estudio, aparte de que algunos de los fetos no llegan a nacer y por tanto ésta no es una muestra o población comparable a la de recién nacidos. Algunos trabajos que ofrecen cifras de frecuencia para alteraciones específicas, como el síndrome de Williams-Beuren, suelen basarse en las historias de los hospitales, sobre todo de los países nórdicos, cuyo sistema les permite obtener datos de toda la población [Strømme y cols., 2002] y con un amplio seguimiento de los pacientes. Lo que se observa en algunos trabajos, sobre todo de revisión es que

estudian grupos de niños afectados por microdeleciones/microduplicaciones y valoran las que son más frecuentes dentro de ese grupo. Sin embargo, la selección del grupo es determinante para que la frecuencia que se ofrece tenga más o menos sesgos.

1.3- Desarrollo de las técnicas moleculares

1.3.1- Fluorescence in situ hybridization

En la década de los años 1980 se hicieron avances en citogenética molecular basados en marcajes fluorescentes (con fluorocromos), hibridándolos con preparados de cromosomas, lo que se llamó “hibridación *in situ* con fluorescencia” (FISH del inglés *Fluorescence in situ hybridization*) [Pinkel y cols en 1986]. Una tecnología que se fue mejorando e incorporando a los laboratorios de citogenética clínica, lo que supuso otra importante herramienta para la identificación de alteraciones cada vez más pequeñas de la estructura de los cromosomas. La FISH es una técnica basada en la estructura de doble cadena del ADN, concretamente en el hecho de que las bases nitrogenadas del ADN son complementarias: la adenina se une con la timina y la citosina con la guanina. La técnica de FISH consiste en diseñar un fragmento de ADN, denominado sonda, que tiene una secuencia de bases complementaria a una región candidata en el genoma objeto de estudio. Esta sonda se marca con una sustancia fluorescente (un fluorocromo) y se añade a la preparación de células que se quieren analizar. Mediante calor, el ADN se desnaturaliza, separándose las dos cadenas, y la secuencia génica en el ADN en estudio que es complementaria a la de la sonda fluorescente se une (hibrida) con ésta y queda marcada con una señal fluorescente que puede visualizarse en un microscopio de fluorescencia. La resolución de las técnicas de citogenética molecular se define como el tamaño mínimo que debe tener una alteración para ser detectada, y se mide en nucleótidos o pares de bases. Las posibilidades que ofrece la metodología de FISH han dado lugar al desarrollo de técnicas con diferente resolución y objetivos diagnósticos. Entre ellas, podemos destacar (Figura. 3):

- a) Pintado de cromosomas completos (Fig. 3a).
- b) Localización de centrómeros (Fig. 3b).
- c) Marcado de regiones teloméricas (Fig. 3c-a) y subteloméricas (Fig. 3c-b).

- d) Identificación de regiones de ADN específicas de pequeño tamaño (microdeleciones)(Fig. 3d).
- e) Cariotipo multicolor o espectral (multi-FISH o SKY-FISH), que tiñe cada cromosoma con una combinación de fluorocromos diferente (Fig. 3e).
- f) Array CGH, del que más adelante hablaremos (Fig.3f).

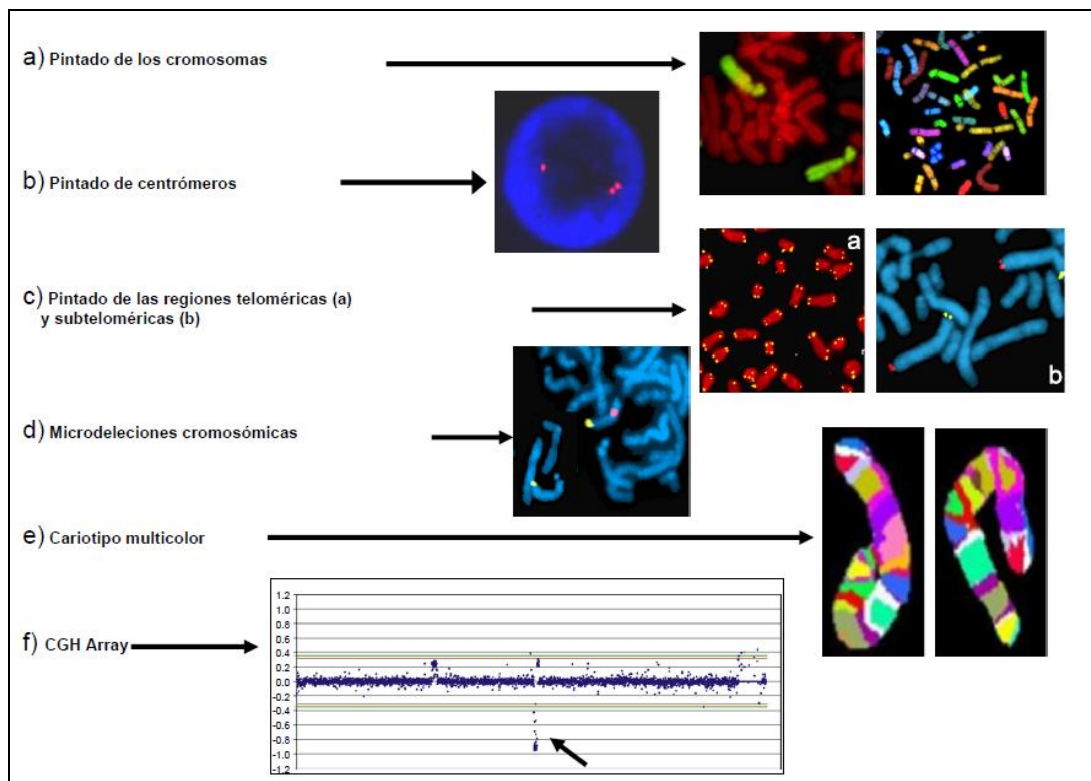


Figura 3: Posibilidades de estudio que ofrece la metodología de la FISH [Sánchez-Izquierdo et al., 2010]

Cuando el cariotipo de alta resolución es normal, se pueden aplicar técnicas de FISH, pero éstas tienen que ser dirigidas por la clínica que presente el paciente. Hoy día se han reconocido diferentes cuadros clínicos producidos por deleciones en determinadas regiones críticas de algunos cromosomas que se denominan síndromes de microdeleción (porque suelen tener un tamaño menor de 3Mb, y por tanto no visualizables siquiera mediante citogenética de alta resolución), para los que existen sondas específicas comercializadas. Por tanto, el paso siguiente al estudio citogenético de alta resolución es analizar estos síndromes, siempre que la clínica del paciente permita sospechar que puede tener alguno de ellos. Por tanto, para esto se debe tener

un buen conocimiento de los distintos tipos de síndromes con alteraciones cromosómicas crípticas.

1.3.2- Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)

La técnica de MLPA fue descrita por primera vez por Schouten y colaboradores en 2002, y es una técnica capaz de identificar deleciones o duplicaciones de pequeñas regiones del genoma que contienen genes asociados a síndromes clínicos conocidos o de regiones subteloméricas asociadas a retraso mental. Demuestra una alta sensibilidad y especificidad en la detección de pérdidas o ganancias no visibles mediante las técnicas citogenéticas convencionales o de alta resolución y FISH. La técnica de MLPA consiste en la hibridación de sondas que hibridan en diferentes puntos de la región de interés y posteriormente se amplifican mediante PCR. Un análisis de fragmentos posterior y aprovechando la diferencia de tamaño de cada una de las sondas debido a un fragmento cebador de tamaño, se pueden identificar pérdidas o ganancias de material genético, atendiendo a la normalización de las áreas de cada pico en la representación gráfica, con respecto a un control sano.

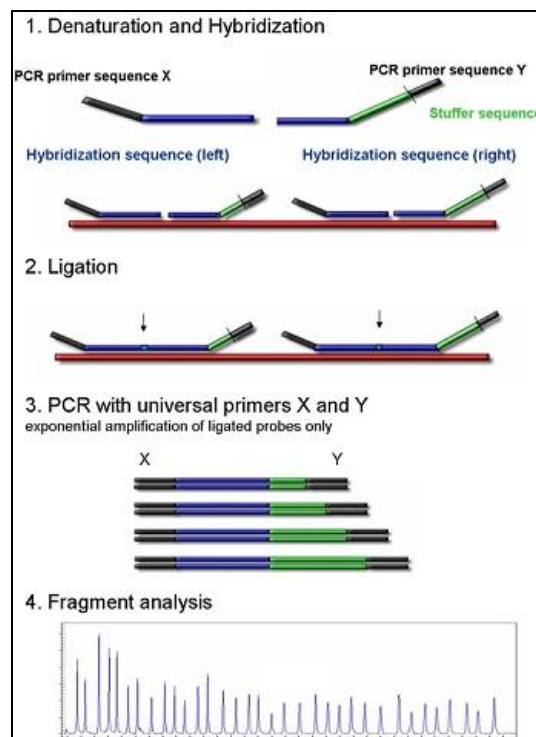


Figura 4. Protocolo de la técnica de MLPA (www.mlpa.com)

1.3.3- Array-based Comparative Genomic Hybridization (array CGH)

Utilizando como punto de partida los fundamentos de la FISH, a principio de los años 90 se desarrolló una nueva tecnología denominada hibridación genómica comparada (CGH de sus siglas en inglés) (Kallioniemi y cols. 1992). Esta CGH se hace sobre un chip (array) que contiene cientos de miles de pequeños fragmentos de ADN genómico de localización conocida (denominados sondas). La técnica de hibridación comparada sobre chips se denomina array CGH y consiste en mezclar el ADN del paciente marcado con un fluorocromo verde y el de un individuo normal o de referencia con un fluorocromo rojo. En esta situación, ambos ADN (paciente y referencia) compiten por hibridar en los mismos lugares cromosómicos. Si el ADN del paciente no tiene alteraciones, el resultado va a mostrar una tinción fluorescente amarilla y homogénea resultante de la mezcla, porque la cantidad de ADN rojo y verde es igual (esto es en proporción 1:1). Sin embargo, si el ADN del paciente tiene una delección (pérdida de ADN), o una ganancia (duplicación) en una región cromosómica determinada, el patrón de fluorescencia mostrará en esa zona incremento de la señal roja en caso de delección (ya que habrá más cantidad de ADN normal), o de la señal verde en caso de ganancia (porque habrá más ADN en el paciente). Estos resultados se representan en una gráfica similar a la de la figura 3f.

La interpretación de los resultados de un arrayCGH no siempre es fácil. En los últimos años y gracias al proyecto de secuenciación del genoma humano [The 1000 Genomes Project Consortium, 2010], sabemos más sobre su estructura (arquitectura). Esta arquitectura consiste en una gran variabilidad estructural, formada por una gran cantidad de variaciones constitucionales [Currall et al 2013]. De tal manera que existen pequeñas duplicaciones o deleciones a lo largo del todo el genoma, que se están relacionando con la susceptibilidad para padecer algunas enfermedades. Estas variaciones de pequeño tamaño son muy frecuentes en todos los seres humanos y se denominan polimorfismo de una sola base o SNP (de su denominación en inglés *Single Nucleotide Polymorphism*).

Otra variación, aunque de mayor tamaño (entre 1Kb y 1Mb) que los SNP, son las llamadas variaciones del número de copia o CNV (del inglés *Copy Number Variants*). En la Figura 5, se muestra que a medida que aumentan de tamaño, su frecuencia es menor; posiblemente porque al ser de mayor tamaño, su efecto sobre el fenotipo es más deletéreo.

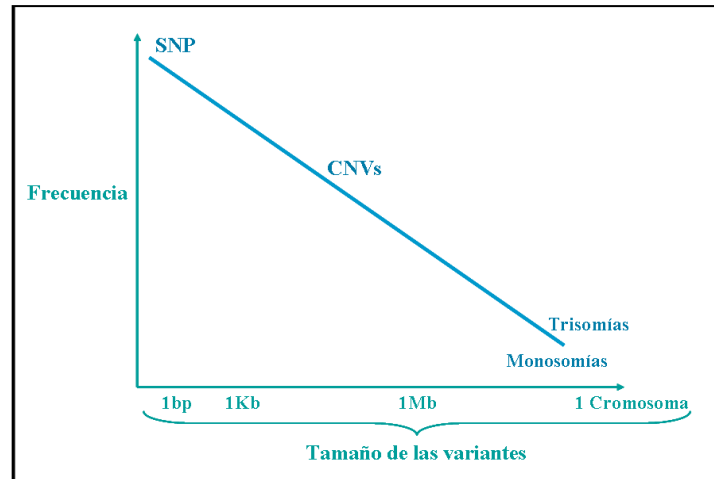


Figura 5: Variaciones genéticas del genoma (modificado de Girirajan y cols., 2011)

Dado que el descubrimiento de estas variaciones del ADN se realizó en grupos de personas sanas de la población, se consideraron polimorfismos. De hecho, al comparar las variaciones observadas en las distintas personas y grupos de población, se consideró que los seres humanos diferimos más por las variaciones estructurales del genoma, que por los propios genes [lafrate y cols., 2004; Redon y cols., 2006].

Aunque aún existen dificultades para interpretar los resultados de los arrayCGH en pacientes con defectos congénitos, dada su alta resolución cada vez se utilizan más en la práctica clínica. De hecho, algunos autores ya han empezado a considerar que en muy poco tiempo sustituirán a los cariotipos. Sin embargo, por ahora hay argumentos en contra de esta sustitución. El arrayCGH no es capaz de detectar alteraciones estructurales balanceadas, como translocaciones o inversiones, que si son visibles en un cariotipo, y este tipo de alteraciones también tienen su importancia. En definitiva, todas las técnicas moleculares son complementarias y se debe seguir haciendo el cariotipo de alta resolución.

Es necesario para la interpretación de resultados de CGH, tener una detallada y completa descripción clínica del paciente, para poder hacer una buena correlación entre el hallazgo genómico y los defectos del paciente. Y además, se debe consultar la variación encontrada en las bases de datos que hay disponibles: *Database of Genomic Variants* o *Ensembl*, para conocer si se han encontrado también en población sana, lo que se interpretaría como un polimorfismo sin repercusión clínica.

1.4- Descripción del Estudio Colaborativo Español de Malformaciones Congénitas (ECEMC)

En España, existe desde hace 40 años un proyecto llamado “Estudio Colaborativo Español de Malformaciones Congénitas (ECEMC)”, que se dedica a la investigación de las causas de los defectos congénitos para tratar de prevenirlos. El ECEMC fue creado por María Luisa Martínez-Frías y fue estructurado como una red temática de investigación cooperativa. En la actualidad desarrolla su actividad en el Centro de Anomalías Congénitas del Instituto de Salud Carlos III de Madrid (Ministerio de Economía y Competitividad). Se trata de un programa de investigación clínico-epidemiológica con un enfoque multidisciplinar y traslacional. Está basado en un sistema permanente de registro de niños recién nacidos con defectos congénitos, de tipo caso-control y base hospitalaria, cuya cobertura se sitúa alrededor del 20% de los nacimientos en España. Es un sistema dinámico de registro y análisis de datos sobre recién nacidos, y mediante la comparación de los datos de los casos y los controles, se pueden inferir relaciones causales entre determinados factores y variables y defectos específicos.

Además de toda la experiencia previa, iniciada en 1976, el grupo de investigación que integra el ECEMC forma parte del *Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER)*, desde que éste fue constituido en 2006. Es importante destacar que las anomalías congénitas, en su mayoría, se encuadran dentro de la definición actual de *Enfermedades Raras*. En la investigación sobre éstas, el ECEMC aporta información epidemiológica sobre los defectos congénitos, al contar con datos obtenidos con una metodología uniforme en hospitales de toda España, en

relación con una serie consecutiva y no seleccionada de recién nacidos, con una muy buena definición clínica y gran cantidad de datos disponibles sobre un amplio grupo de variables, para los estudios causales. Al contar además el grupo del ECEMC con un laboratorio de citogenética (de alta resolución y molecular), viene aplicando este tipo de estudios a la serie de recién nacidos afectados por defectos congénitos (casos).

El ECEMC cuenta con una Red Clínica de más de 400 médicos de más de 150 hospitales de toda España y constituyen el llamado **Grupo Periférico**. En cada hospital participante en el ECEMC existe un equipo de médicos que colaboran voluntariamente (pero siguiendo estrictamente la metodología), vinculados por un “médico responsable”, que es el encargado de dirigir al equipo del hospital en cuanto a su participación, y con el que se comunica directamente con el otro grupo que integra el ECEMC: el **Grupo Coordinador**. El médico responsable ha de asegurarse de que todos los recién nacidos, sin excepción, sean examinados con la misma metodología en busca de defectos congénitos, y de que la recogida de datos se lleve a cabo de acuerdo con la normativa operacional elaborada por el ECEMC [Martínez-Frias Ref. Manual Operacional]. Los médicos colaboradores son, en su gran mayoría, pediatras y algunos obstetras, pero la incorporación al equipo no está reservada a ellos, pudiendo incorporarse al mismo cualquier especialista médico interesado en colaborar, siempre que sea aceptado por el médico responsable del hospital y tras comunicarlo al Grupo Coordinador. Los médicos participantes son los encargados de la detección de los recién nacidos con defectos congénitos en los tres primeros días de vida y de la selección de sus respectivos recién nacidos controles, de la recogida de la información en los protocolos elaborados por el ECEMC, y del envío mensual de toda esa información, incluyendo fotos y resultados de estudios complementarios, así como el consentimiento informado de los progenitores, a la sede del Grupo Coordinador. El ECEMC cuenta con la aprobación del CEIyBA (Comité de Ética de la Investigación y Bienestar Animal) del Instituto de Salud Carlos III.

El **Grupo Coordinador** es multidisciplinario. Está constituido por biólogos, médicos y especialistas en Estadística e Informática, y personal auxiliar. El Grupo Coordinador, a través de sus 4 secciones (Genética Clínica, Epidemiología de Anomalías

Congénitas, Citogenética de Alta Resolución y Citogenética Molecular, y Teratología Clínica), lleva a cabo el procesamiento de toda la información, su adecuado almacenamiento, tanto físico como en soporte informático, efectúa una valoración de toda la información disponible sobre cada caso con el fin de llegar a un diagnóstico etiológico (genético o ambiental), trata de definir los procesos patogénicos que han tenido lugar en cada caso, efectúa en el laboratorio del ECEMC los análisis citogenéticos de alta resolución y moleculares si procede, y transmite al médico responsable de cada caso en el Grupo Periférico, el resultado de la valoración llevada a cabo con la participación de las 4 secciones.

Su definición operacional convierte al ECEMC en un estudio retrospectivo de tipo caso-control. Es **retrospectivo** porque una vez detectados los recién nacidos afectados por los defectos congénitos y sus controles recién nacidos sanos, recoge datos sobre eventos gestacionales, pregestacionales y familiares ya acaecidos en el momento del nacimiento, que es el momento en que se recoge la información. Es un estudio de tipo **caso-control** porque la misma información que se recoge para un grupo de recién nacidos afectados (casos), se recoge para un grupo de recién nacidos sin defectos congénitos (controles), que constituyen el grupo de comparación. Se selecciona un control por cada caso, nacido inmediatamente después que éste, y tienen que ser del mismo sexo y nacidos en el mismo hospital.

Además los médicos colaboradores extraen sangre de todo niño que presente defectos congénitos mayores y/o menores, para realizarle un estudio cromosómico en el laboratorio del ECEMC. Este estudio es necesario por las siguientes razones:

- ✓ Las anomalías cromosómicas, tanto del número como de la estructura, constituyen la principal causa conocida de las alteraciones en el desarrollo embrionario y fetal.(Figura 6)

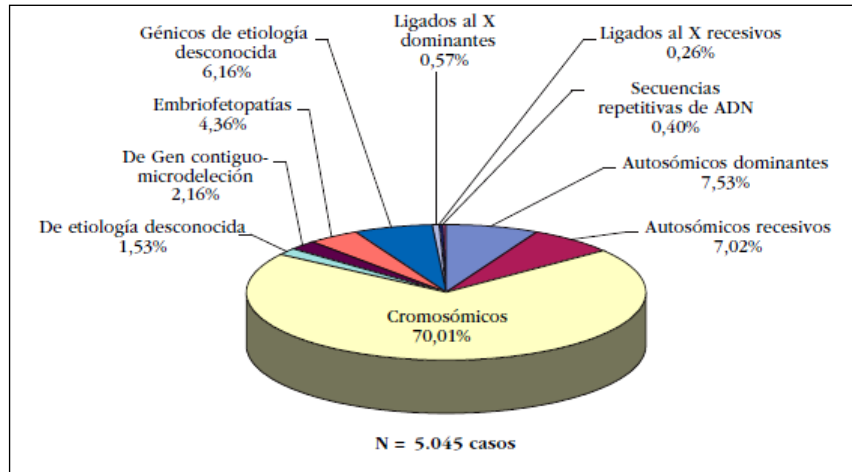


Figura 6. Distribución causal de los niños recién nacidos con defectos congénitos y diagnosticados con síndromes en el ECEMC (Datos del año 2011)

- ✓ Con las técnicas de estudio actuales de cromosomas de alta resolución (550-850 bandas) y técnicas moleculares (FISH, MLPA, aCGH), se detectan alteraciones cromosómicas crípticas, incluyendo las de las zonas subteloméricas de todos los cromosomas. La identificación de estas alteraciones muy pequeñas de los cromosomas permite establecer el diagnóstico del niño, y cuando procede se debe realizar el estudio en los padres para determinar los riesgos de repetición familiar y las posibilidades de diagnóstico prenatal.
- ✓ Además también se realiza un estudio cromosómico a los niños con anomalías congénitas en los que se ha diagnosticado un síndrome mendeliano o un síndrome clínico bien definido pero de causa desconocida, porque podrían tener alguna alteración cromosómica. En este caso, la localización de esa alteración puede ayudar a identificar el gen o genes causantes del síndrome.

Asimismo, un aspecto muy importante que se debe considerar es que la especificidad clínica para los diferentes tipos de alteraciones cromosómicas, excepto para la trisomía 21 o síndrome de Down, es relativamente baja. Por tanto, cualquier niño con malformaciones congénitas, debe ser considerado candidato a tener una alteración cromosómica.

Generalmente, el tipo de muestras que se analizan en el laboratorio, son de sangre periférica; sin embargo, se han puesto a punto técnicas de cultivo de tejidos (cartílago, piel, hígado, etc) que posibilitan el diagnóstico citogenético en casos en los que, de otro modo es difícil poder realizarlo (recién nacidos muertos, fetos procedentes de interrupción del embarazo, etc.).

El protocolo que seguimos ante todo niño con defectos congénitos se muestra en la Figura 7:

1.- En todos los casos se inicia la evaluación diagnóstica con la realización de un cariotipo de alta resolución (550-850 bandas) y se aplican técnicas de citogenética molecular cuando procede.

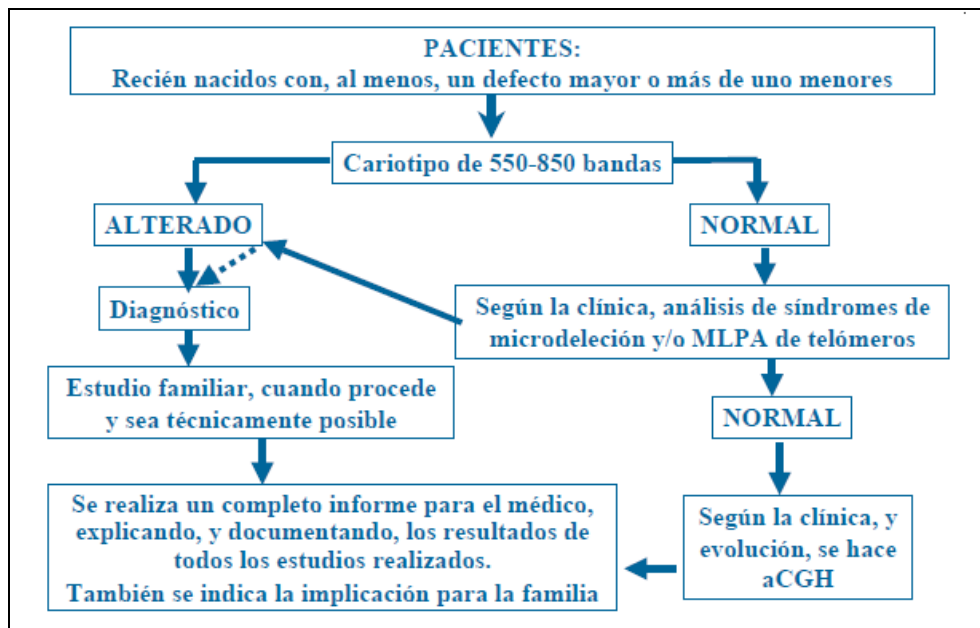


Figura 7.- Protocolo de estudio utilizado en las muestras recibidas en el laboratorio del ECEMC.

2.- Ante un estudio cromosómico alterado, hay dos posibilidades: que la alteración sea numérica: se encuentran 3 copias de un cromosoma completo (trisomía), o 4 copias (tetrasomía), o una sola copia (monosomía), o hay más de 2 juegos completos de todos los cromosomas (poliploidías) lo que supone dar un diagnóstico definitivo. O bien, que la alteración sea estructural, que puede ser de varios tipos, como ya hemos explicado anteriormente. En este caso hay que realizar un estudio citogenético familiar para establecer si hay otros portadores en la familia

(padres, hermanos, abuelos) o se trata de una alteración producida “de novo” en el paciente. En muchas de estas alteraciones estructurales, es necesario aplicar técnicas moleculares (FISH, MLPA) para confirmar cuáles son las regiones cromosómicas implicadas en la alteración.

3.- Si el estudio cromosómico de alta resolución es normal, pero las manifestaciones clínicas sugieren algún síndrome de microdelección conocido, en el laboratorio del ECEMC se aplican las técnicas moleculares con sondas específicas para cada síndrome.

4.- Si el estudio cromosómico de alta resolución es normal, pero las manifestaciones clínicas no sugieren ningún síndrome concreto de microdelección, se descartan otros reordenamientos crípticos mediante la aplicación de técnicas de FISH, con sondas específicas para las regiones subteloméricas, especialmente si se aprecian retrasos en las adquisiciones normales del desarrollo, o retraso mental en su evolución.

5.- Si todos los estudios anteriores han resultado ser normales, y valorando los rasgos clínicos del paciente, se estudia mediante array CGH.

OBJETIVOS

2- OBJETIVOS

Los objetivos concretos de este trabajo son:

1. Investigar la causa genética de los defectos congénitos en una serie consecutiva (no seleccionada) de niños recién nacidos.
2. Determinar cuáles son las alteraciones cromosómicas estructurales más frecuentes, en una muestra grande de niños recién nacidos consecutivos con defectos congénitos de cualquier tipo, identificados durante los últimos 30 años (desde el momento en que se creó el laboratorio del ECEMC).
3. Formar grupos homogéneos de pacientes que tengan las mismas alteraciones cromosómicas estructurales.
4. Establecer correlaciones genotipo-fenotipo en algunos grupos de alteraciones estructurales de los cromosomas.
5. Trasladar los resultados de la investigación sobre defectos congénitos a la práctica clínica.

PUBLICACIONES

3.- PUBLICACIONES

Inicié mi formación sobre las causas de las malformaciones congénitas en el ECEMC en el año 2003, momento en que me incorporé al laboratorio de citogenética y citogenética molecular de dicho grupo. Durante estos años, aparte de haber recibido formación clínica relativa a los tipos de defectos congénitos en niños recién nacidos, aprendí toda la tecnología de citogenética disponible en el laboratorio. Como consecuencia de mi trabajo he podido participar en todas las actividades científicas del grupo y publicar un total de 42 artículos científicos: 20 en revistas extranjeras y 22 en revistas españolas.

3.1- Publicaciones en revistas extranjeras

2005-2006

1. Rodríguez L, Zollino M, Climent S, Mansilla E, López-Grondona F, **Martínez-Fernández ML**, Murdolo M, Martínez-Frías ML. The new Wolf-Hirschhorn syndrome critical region (WHSCR-2). A description of a second case. *Am J Med Genet A*. 2005 Jun 15; 136(2):175-8. PMID: 15948183. Factor de Impacto: 1,913
2. Martínez-Frías ML, Pérez B, Desviat LR, Castro M, Leal F, Rodríguez L, Mansilla E, **Martínez-Fernández ML**, Bermejo E, Rodríguez-Pinilla E, Prieto D, Ugarte M; ECEMC Working Group. Maternal polymorphisms 677C-T and 1298A-C of MTHFR, and 66A-G MTRR genes: is there any relationship between polymorphisms of the folate pathway, maternal homocysteine levels, and the risk for having a child with Down syndrome? *Am J Med Genet A*. 2006 May 1;140(9):987-97. PMID: 16575899. Factor de Impacto: 2,063.

2007-2008

3. Chabchoub E, Rodríguez L, Galan E, Mansilla E, **Martínez-Fernández ML**, Martínez-Frías ML, Fryns JP, Vermeesch JR. Molecular characterisation of a mosaicism with a complex chromosome rearrangement: evidence for coincident chromosome healing by telomere capture and neo-telomere formation. *J Med Genet*. 2007 Apr;44(4):250-6. PMID: 17172463. Factor de Impacto: 5,535.
4. Rodríguez L, Zollino M, Mansilla E, **Martínez-Fernández ML**, Pérez P, Murdolo M, Martínez-Frías ML. The first 4p euchromatic variant in a healthy carrier

- having an unusual reproductive history. *Am J Med Genet A*. 2007 May 1; 143(9): 995-8. PMID: 17431893. Factor de Impacto: 2,440.
5. Rodríguez L, Liehr T, Mrasek K, Mansilla E, **Martínez-Fernández ML**, García A, Martínez-Frías ML. Small supernumerary chromosome marker generating complete and pure trisomy 18p, characterized by molecular cytogenetic techniques and review. *Am J Med Genet A*. 2007 Nov 15; 143A(22):2727-32. Review. PMID: 17937429. Factor de Impacto: 2,440.
 6. Rodríguez L, **Martínez-Fernández ML**, Mansilla E, Mendioroz J, Arteaga RM, Toral FJ, Guardia NM, García A, Centeno F, Pantoja J, Jovani C, Martínez-Frías ML. Screening for subtelomeric chromosome alteration in a consecutive series of newborns with congenital defects. *Clin Dysmorphol*. 2008 Jan; 17(1):5-12. PMID: 18049073. Factor de Impacto: 0,521
 7. Rodríguez L, Liehr T, **Martínez-Fernández ML**, Lara A, Torres A, Martínez-Frías ML. A new small supernumerary marker chromosome, generating mosaic pure trisomy 16q11.1-q12.1 in a healthy man. *Mol Cytogenet*. 2008 Apr 2;1:4. PMID: 18471313. Factor de Impacto: -
 8. Rodríguez L, Niebuhr E, García A, **Martínez-Fernández ML**, Peña Segura JL. Be careful with familial unbalanced chromosome abnormalities! *Am J Med Genet A*. 2008 Aug 1;146A(15):2005-7. PMID: 18627044. Factor de Impacto: 2,555.
 9. Rodríguez L, Diego-Alvarez D, Lorda-Sanchez I, Gallardo FL, **Martínez-Fernández ML**, Arroyo-Muñoz ME, Martínez-Frías ML. A small and active ring X chromosome in a female with features of Kabuki syndrome. *Am J Med Genet A*. 2008 Nov 1;146A(21):2816-21. PMID: 18925662. Factor de Impacto: 2,555.

2009-2010

10. Rodríguez L, **Martínez-Fernández ML**, Aceña MI, López Mendoza S, Martín Fumero L, Rodríguez de Alba M, Gallego-Merlo J, Martínez-Frías ML. Dicentric inverted duplication of entire 4p arm with no apparent deletion and internal placing of the (-TTAGGG-)n sequence: description of the first patient. *Am J Med Genet A*. 2009 May; 149A(5): 1058-61. PMID: 19353587. Factor de Impacto: 2,404
11. MacDonald AH, Rodríguez L, Aceña I, **Martínez-Fernández ML**, Sánchez-Izquierdo D, Zuazo E and Martínez-Frías M.L. Subtelomeric Deletion of 12p: Description of a Third Case and Review. *Am J Med Genet A* 2010 Jun, 152^a(6):1561–66. PMID: 20503336. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/ajmg.a.33401>. Factor de Impacto: 2,505.

2011-2013

12. Bonaglia MC, Giorda R, Beri S, De Agostini C, Novara F, Fichera M, Grillo L, Galesi O, Vetro A, Ciccone R, Bonati MT, Giglio S, Guerrini R, Osimani S, Marelli S, Zucca C, Grasso R, Borgatti R, Mani E, Motta C, Molteni M, Romano C, Greco D, Reitano S, Baroncini A, Lapi E, Cecconi A, Arrigo G, Patricelli MG, Pantaleoni C, D'Arrigo S, Riva D, Sciacca F, Dalla Bernardina B, Zoccante L, Darra F, Termine C, Maserati E, Bigoni S, Priolo E, Bottani A, Gimelli S, Bena F, Brusco A, di Gregorio E, Bagnasco I, Giussani U, Nitsch L, Politi P, Martinez-Frias ML, **Martínez-Fernández ML**, Martínez Guardia N, Bremer A, Anderlid BM, Zuffardi O. Molecular mechanisms generating and stabilizing terminal 22q13 deletions in 44 subjects with Phelan/McDermid Syndrome. *PLoS Genet*. 2011 Jul;7(7):e1002173. PMID: 21779178. [doi:10.1371/journal.pgen.1002173](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002173). Factor de Impacto: 9,543.
13. Palomares Bralo M, Delicado A, Mansilla E, de Torres ML, Vallespín E, Fernández L, Martínez- Glez V, García-Miñaur S, Nevado J, Santos Simarro F, Ruiz-Perez VL, Lynch SA, Sharkey FH, Thuresson AC, Annerén G, Belligni EF, **Martínez-Fernández ML**, Bermejo E, Nowakowska B, Kutkowska-Kazmierczak A, Bocian E, Obersztyn E, Martínez-Frías ML, Hennekam RCM, Lapunzina P. Characterization of a 8q21.11 microdeletion syndrome associated with intellectual disability and a recognizable phenotype. *Am J Hum Genet*. 2011 Aug 12;89(2):295-301. PMID: 21802062. [doi:10.1016/j.ajhg.2011.06.012](https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.06.012). Factor de Impacto: 11,680.
14. Martínez-Frías ML, **Martínez-Fernández ML**. A highly specific coding system for structural chromosomal alterations. *Am J Med Genet A*. 2013 Apr;161A(4):732-6. doi: 10.1002/ajmg.a.35787. PMID:23495121. Factor de Impacto: 2,305.
15. Carrascosa-Romero MC, Suela J, Pardal Fernández JM , Bermejo-Sánchez E, Vidal Company A, MacDonald A, Tébar Gil R, **Martínez-Fernández ML**, Martínez-Frías ML. A 2.84 Mb deletion at 21q22.11 in a patient clinically diagnosed with Marden-Walker syndrome. *Am J Med Genet A*. 2013 Sep; 161A(9):2281-90. doi: 10.1002/ajmg.a.35862. Factor de Impacto: 2,305.

2014-2015

16. **Martínez-Fernández ML**, Bermejo-Sánchez E, Fernández B, Macdonald A, Fernández-Toral J, Martínez-Frías ML. Haploinsufficiency of BMP4 gene may be the underlying cause of Frías syndrome. *Am J Med Genet A*. 2014 Feb;164A(2):338-45. PMID: 24311462. doi: 10.1002/ajmg.a.36224. Factor de Impacto: 2,159.
17. Martínez-Frías ML, Ocejó-Vinyals JG, Arteaga R, **Martínez-Fernández ML**, Macdonald A, Pérez-Belmonte E, Bermejo-Sánchez E, Martínez S. Interstitial deletion 14q22.3-q23.2: Genotype-phenotype correlation. *Am J Med Genet A*.

- 2014 Mar;164A(3):639-47. PMID: 24357464. doi: 10.1002/ajmg.a.36330. Factor de Impacto: 2,159.
18. Tenorio J, Mansilla A, Valencia M, Martínez-Glez V, Romanelli V, Arias P, Castrejón N, Poletta F, Guillén-Navarro E, Gordo G, Mansilla E, García-Santiago F, González-Casado I, Vallespín E, Palomares M, Mori MA, Santos-Simarro F, García-Miñaur S, Fernández L, Mena R, Benito-Sanz S, del Pozo Á, Silla JC, Ibañez K, López-Granados E, Martín-Trujillo A, Montaner D; **SOGRI Consortium (Martínez-Fernández ML)**, Heath KE, Campos-Barros Á, Dopazo J, Nevado J, Monk D, Ruiz-Pérez VL, Lapunzina P. A new overgrowth syndrome is due to mutations in RNF125. *Hum Mutat.* 2014 Dec;35(12):1436-41. doi: 10.1002/humu.22689. Factor de Impacto: 5,340
 19. **Martínez-Fernández ML**, Fernández-Toral J, Llano-Rivas I, Bermejo-Sánchez E, Martínez-Frías ML. Delineation of the clinically recognizable 17q22 contiguous gene deletion syndrome in a patient carrying the smallest microdeletion known to date. *Am J Med Genet A.* 2015 Apr 21. doi: 10.1002/ajmg.a.37117.
 20. Arroyo-Carrera I, de Zaldívar Tristancho MS, Bermejo-Sánchez E, **Martínez-Fernández ML**, López-Lafuente A, MacDonald A, Zúñiga Á, Luis Gómez-Skarmeta J, Luisa Martínez-Frías M. Deletion 1q43-44 in a patient with clinical diagnosis of Warburg-Micro syndrome. *Am J Med Genet A.* 2015 Apr 21. doi: 10.1002/ajmg.a.36878.PMID: 25899426

3.2- Publicaciones en revistas españolas

2003-2006

1. López-Grondona F, Rodríguez L, Mansilla E, **Martínez-Fernández ML**, Arteaga RM, Gómez-Ullate J, Martínez-Frías ML. Monosomía 1p36: Un síndrome clínicamente reconocible. *Boletín del ECEMC: Revista de Dismorfología y Epidemiología.* Oct. 2003. Serie V, nº 2: 11-14. http://bvs.isciii.es/mono/pdf/CIAC_02.pdf
2. López-Grondona F, Rodríguez L, Mansilla E, **Martínez-Fernández ML**, Martínez-Frías ML. Deleción 14q proximal, presentación de dos casos y revisión de la literatura. *Boletín del ECEMC: Revista de Dismorfología y Epidemiología.* Oct. 2004. Serie V, nº 3: 18-24. http://bvs.isciii.es/mono/pdf/CIAC_03.pdf
3. Rodríguez L, **Martínez-Fernández ML**, Mansilla E, Blanco Soto P, Martín Sanz F, Martínez-Frías ML. Trisomía parcial 7q y monosomía subtelomérica 20p. Presentación clínica de un caso y revisión. *Boletín del ECEMC: Revista de Dismorfología y Epidemiología.* Oct. 2005. Serie V, nº 4: 14-18. http://bvs.isciii.es/mono/pdf/CIAC_04.pdf

4. Mansilla E, Rodríguez L, **Martínez-Fernández ML**, Rodríguez de Cía J, García Vicent C, Martínez-Frías ML. Monosomía parcial 10p en un caso con fenotipo similar al síndrome de Ritscher-Schinzel. *Boletín del ECEMC: Revista de Dismorfología y Epidemiología*. Oct. 2006. Serie V, nº 5: 18-25. http://bvs.isciii.es/mono/pdf/CIAC_05.pdf

2007-2008

5. Martínez-Frías ML, Bermejo E, Rodríguez-Pinilla E, Rodríguez L, López Grondona F, Mansilla E, **Martínez-Fernández M.L**, Cuevas L, Grupo Periférico del ECEMC and Grupo de trabajo de REPIER. Evolución secular y por comunidades autónomas de la frecuencia de síndrome de Down al nacimiento en hijos de madres jóvenes. *Progr. Obstet. Ginecol* Feb. 2007; 50(2): 67-80. Factor de Impacto: -
6. Mansilla E, Rodríguez L, **Martínez-Fernández ML**, Lara Palma A, Torres A, Morcillo L, Esteban Marfil MV, Martínez-Frías ML. Deleción parcial 5p y duplicación parcial 5q derivadas de una inversión pericéntrica familiar. *Boletín del ECEMC: Revista de Dismorfología y Epidemiología*. Oct. 2007. Serie V, nº 6: 12-19. http://bvs.isciii.es/mono/pdf/CIAC_06.pdf
7. Martínez-Frías ML, Bermejo E, Pérez B, Desviat LR, Castro M, Leal F, Mansilla E, **Martínez-Fernández ML**, Rodríguez-Pinilla E, Rodríguez L, Ugarte M; Grupo de Trabajo del Estudio Colaborativo Español de Malformaciones Congénitas (ECEMC). Análisis de las frecuencias de todas las combinaciones genotípicas de 4 polimorfismos de genes implicados en el ciclo del folato en la población española. *Med Clin (Barc)*. 2008 Jun 21;131(3):81-8. PMID: 18590621. Factor de Impacto: 1,258
8. **Martínez-Fernández ML**, Rodríguez L, López Mendoza S, Aceña MI, Lapunzina P, Martínez-Frías ML. Síndrome de Prader-Willi por disomía uniparental materna y un cariotipo con un cromosoma marcador en mosaico. *Boletín del ECEMC: Revista de Dismorfología y Epidemiología*. Oct. 2008. Serie V, nº 7: 22-27. http://bvs.isciii.es/mono/pdf/CIAC_07.pdf

2009-2010

9. Iglesias Escalera G, Carrasco Marina ML, Martín Del Valle F, Martínez Guardia N, Rodríguez L, **Martínez-Fernández ML**. Síndrome de Miller-Dieker. *An Pediatr (Barc)*. 2009 Mar;70(3):304-6. PMID: 19409251. Factor de Impacto: 0,363
10. **Martínez-Fernández ML**, Aceña MI, MacDonald A, Centeno Malfaz F, Delicado A, Palomares M, Lapunzina P, Martínez-Frías ML. Paciente con Síndrome de Cri-du-Chat y de Beckwith-Wiedemann originados por un derivado de translocación paterna. *Boletín del ECEMC: Revista de Dismorfología y Epidemiología*. Oct. 2009. Serie V, nº 8: 46-53. http://www.ciberer.es/documentos/ECEMC_2009_AF.pdf

11. Aceña MI, MacDonald A, Rodríguez L, **Martínez-Fernández ML**, Martínez Carrascal A, Zollino M, Martínez-Frías ML. Reordenamientos cromosómicos complejos (CCRs): Presentación de un nuevo caso con 5 puntos de rotura entre los cromosomas 4 y 8. *Boletín del ECEMC: Revista de Dismorfología y Epidemiología*. Oct. 2009. Serie V, nº 8: 54-62. http://www.ciberer.es/documentos/ECEMC_2009_AF.pdf
12. **Martínez-Fernández ML**, Sánchez-Izquierdo MD, Martínez-Frías ML. Resumen de la evolución de las técnicas de citogenética y genética molecular para la identificación de las alteraciones genéticas del desarrollo embrionario. *Revista SEMERGEN*. Nov. 2010; 36(9):520-5. ISSN: 1138-3593. DOI: 10.1016/j.semerg.2010.09.002 http://www.elsevier.es/revistas/ctl_servlet? f=7032&revistaid=40
13. **Martínez-Fernández ML**, Bermejo E, Martínez-Frías ML. Ejemplos clínicos de alteraciones crípticas del ADN y guías para sospechar que un niño pueda tener alguna alteración críptica o molecular. *Revista SEMERGEN*. Dic. 2010. 36(10): 573-8. http://www.elsevier.es/revistas/ctl_servlet? f=7032&revistaid=40 ISSN: 1138-3593. DOI: <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.semerg.2010.09.004>
14. Sánchez-Izquierdo MD, **Martínez-Fernández ML** y Martínez-Frías ML. ¿Qué son los microarrays? Aplicación al diagnóstico de anomalías congénitas. *Boletín del ECEMC: Revista de Dismorfología y Epidemiología*. Dic, 2010. Serie V, nº 9: 48-54. http://www.ciberer.es/documentos/ECEMC_2010_AF.pdf.
15. Aceña I + MacDonald A, **Martínez-Fernández ML**, Bermejo E, Martínez-Frías ML. Análisis clínico epidemiológico de las niñas recién nacidas con Síndrome de Turner y de aquellas con tres cromosomas X. *Boletín del ECEMC: Revista de Dismorfología y Epidemiología*. Dic, 2010; Serie V, nº 9: 55-66. http://www.ciberer.es/documentos/ECEMC_2010_AF.pdf

2011-2012

16. Martínez-Frías ML, Rodríguez-Pinilla E, Bermejo E, **Martínez-Fernández ML**. Pautas de prevención de defectos congénitos con especial referencia a los niveles primario y secundario. Guías de actuación preventiva desde la atención primaria. *Revista SEMERGEN*. Oct. 2011; 37(8):412-417. ISSN: 1138-3593. <http://dx.doi.org/10.1016/j.semerg.2011.03.009>
17. **Martínez-Fernández ML**, MacDonald A, Aceña I, Bermejo-Sánchez E, Grupo Periférico del ECEMC, Martínez-Frías ML. Análisis de alteraciones cromosómicas estructurales y su distribución por cromosoma en la serie de recién nacidos con defectos congénitos del ECEMC. Bol ECEMC: Rev Dismor Epidemiol. Serie VI, Nº 1. Ed. ML Martínez-Frías. CIAC, Instituto de Salud Carlos III. Madrid, 2011. (ISSN 0210-3893). Access: <http://publicaciones.isciii.es>
18. Aldea Romero AE, López Dueñas A, Rubio Jiménez ME, Hernández Bejarano MJ, García García A, **Martínez-Fernández ML**, Bermejo-Sánchez E, Martínez-Frías

- ML. Descripción de un nuevo caso de síndrome de Bohring-Opitz (o de Oberklaid-Danks). Bol ECEMC: Rev Dismor Epidemiol. Serie VI, Nº 1. Ed. ML Martínez-Frías. CIAC, Instituto de Salud Carlos III. Madrid, 2011. (ISSN 0210-3893). Acceso: <http://publicaciones.isciii.es>
19. Arroyo Carrera I, García García MJ, Lozano Rodríguez JA, Polo Antúnez A, Zunzunegui JL, Alvarez T, **Martínez-Fernández ML**, Bermejo-Sánchez E. Síndrome de Sörsby: Descripción de un caso que representa la segunda familia descrita. Bol ECEMC: Rev Dismor Epidemiol. Serie VI, Nº 1. Ed. ML Martínez-Frías. CIAC, Instituto de Salud Carlos III. Madrid, 2011. (ISSN 0210-3893). Acceso: <http://publicaciones.isciii.es>
20. Martínez-Frías ML, Arteaga R, **Martínez-Fernández ML**, Bermejo-Sánchez E. Síndrome de Johnson-McMillin: Descripción del primer paciente de España. Bol ECEMC: Rev Dismor Epidemiol. Serie VI, Nº 2. Ed. ML Martínez-Frías. CIAC, Instituto de Salud Carlos III. Madrid, 2012. (ISSN 0210-3893). Acceso: <http://publicaciones.isciii.es>
21. MacDonald A, **Martínez-Fernández ML**, Aceña I, Serrano Madrid ML, Romero Gil R, Bermejo-Sánchez E, Martínez-Frías ML. Un nuevo paciente con delección 10p y revisión de la literatura. Estudio de la correlación genotipo-fenotipo. Bol ECEMC: Rev Dismor Epidemiol; Serie VI, Nº2. Ed. ML Martínez-Frías. CIAC, Instituto de Salud Carlos III. Madrid, 2012. (ISSN 0210-3893). Acceso: <http://revistas.isciii.es/ecemc>

2014

22. Arroyo Carrera I, López Cuesta MJ, Lozano Rodríguez JA, **Martínez-Fernández ML**. Síndrome oro-facio-digital tipo II: caso clínico y diagnóstico diferencial. An Pediatr (Barc). 2014 Mar;80(3):e71-3. doi: 10.1016/j.anpedi.2013.06.021. PMID: 24055324.

3.3- Publicaciones seleccionadas para esta tesis

De todas estas publicaciones, las que he seleccionado para esta Tesis Doctoral son las siguientes, por orden en el que las voy a comentar en la discusión:

1. **Martínez-Fernández ML**, MacDonald A, Aceña I, Bermejo-Sánchez E, Grupo Periférico del ECEMC, Martínez-Frías ML. Análisis de alteraciones cromosómicas estructurales y su distribución por cromosoma en la serie de recién nacidos con defectos congénitos del ECEMC. *Bol ECEMC: Rev Dismor Epidemiol*. Serie VI, Nº 1. Ed. ML Martínez-Frías. CIAC, Instituto de Salud Carlos III. Madrid, 2011. (ISSN 0210-3893). Access: <http://publicaciones.isciii.es>
2. Rodríguez L, **Martínez-Fernández ML**, Mansilla E, Mendioroz J, Arteaga RM, Toral FJ, Guardia NM, García A, Centeno F, Pantoja J, Jovani C, Martínez-Frías ML. Screening for subtelomeric chromosome alteration in a consecutive series of newborns with congenital defects. *Clin Dysmorphol*. 2008 Jan; 17(1):5-12. PMID: 18049073. Factor de Impacto: 0,521
3. Rodríguez L, Zollino M, Climent S, Mansilla E, López-Grondona F, **Martínez-Fernández ML**, Murdolo M, Martínez-Frías ML. The new Wolf-Hirschhorn syndrome critical region (WHSCR-2). A description of a second case. *Am J Med Genet A*. 2005 Jun 15; 136(2):175-8. PMID: 15948183. Factor de Impacto: 1,913
4. **Martínez-Fernández ML**, Bermejo-Sánchez E, Fernández B, Macdonald A, Fernández-Toral J, Martínez-Frías ML. Haploinsufficiency of BMP4 gene may be the underlying cause of Frías syndrome. *Am J Med Genet A*. 2014 Feb;164A(2):338-45. PMID: 24311462. doi: 10.1002/ajmg.a.36224. Factor de Impacto: 2,159.
5. **Martínez-Fernández ML**, Fernández-Toral J, Llano-Rivas I, Bermejo-Sánchez E, Martínez-Frías ML. Delineation of the clinically recognizable 17q22 contiguous gene deletion syndrome in a patient carrying the smallest microdeletion known to date. *Am J Med Genet A*. 2015 Apr 21. doi: 10.1002/ajmg.a.37117. Factor de Impacto: (publicado en el año en el que presento esta memoria)
6. Martínez-Frías ML, **Martínez-Fernández ML**. A highly specific coding system for structural chromosomal alterations. *Am J Med Genet A*. 2013 Apr;161A(4):732-6. doi: 10.1002/ajmg.a.35787. PMID:23495121. Factor de Impacto: 2,305.

Análisis de alteraciones cromosómicas estructurales y su distribución por cromosomas en la serie de recién nacidos con defectos congénitos del ECEMC

M.L. Martínez-Fernández

Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER). Madrid.

ECEMC. Centro de Investigación sobre Anomalías Congénitas (CIAC), Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia e Innovación. Madrid.

A. MacDonald

ECEMC. Centro de Investigación sobre Anomalías Congénitas (CIAC), Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia e Innovación. Madrid.

I. Aceña

ECEMC. Centro de Investigación sobre Anomalías Congénitas (CIAC), Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia e Innovación. Madrid.

E. Bermejo-Sánchez

Instituto de Investigación de Enfermedades Raras (IIER), Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia e Innovación. Madrid.

ECEMC. Centro de Investigación sobre Anomalías Congénitas (CIAC), Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia e Innovación. Madrid.

Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER). Madrid.

Grupo Periférico del ECEMC

Se incluye en la Sección VIII de este Boletín.

M. L. Martínez-Frías

ECEMC. Centro de Investigación sobre Anomalías Congénitas (CIAC), Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia e Innovación. Madrid.

Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER). Madrid.

Profa. Depto. de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid.

Corresponsal: m.martinez@isciii.es

Bol ECEMC Rev Dismor Epidemiol VI (n.º 1): 66-82 (2011)

Summary

Title: Analysis of the structural chromosomal anomalies and distribution by chromosomes in the ECEMC's series of newborn infants with congenital defects

This study was aimed at estimating the frequency of unbalanced structural chromosomal anomalies identified in the consecutive series of newborn infants with congenital defects, registered in the Spanish Collaborative Study of Congenital Malformations (ECEMC). These cases were cytogenetically studied at its laboratory since 1981 up to December 2009. A total of 4,681 cases were studied following a protocol established by ECEMC program, which starts by performing a high resolution karyotype (550-850 bands), and if the results are normal, it is followed by the analysis of subtelomeric regions and depending on the clinical manifestations, some FISH and MLPA analyses were applied in order to also rule out microdeletion syndromes. The parents and other relatives were also studied when necessary, according to ECEMC's protocol. A total of 136 cases had unbalanced chromosomal structural anomalies. Data were analyzed either globally

or in two periods including the years 1981-1994, and 1995-2009 which are before and after starting the use of FISH techniques in the ECEMC's laboratory.

Among the 136 total cases having unbalanced structural anomalies, 71.32% were cytogenetically detected, and the remaining 28.68% by FISH. Each type of anomaly was distributed by involved chromosome separating those affecting **p** and **q** arms. In the group of cytogenetically detected anomalies, deletions (42.55% of cases) were 2.1 times more frequent than duplications (20.22%). Deletions affecting short arms were 3 times more frequent than duplications. Among cases detected by FISH techniques, deletions were 15.49 times more frequent than duplications, the 22q11.2 microdeletion being the most common (38.46% of the cases), followed by the deletions in chromosomes 15 (15.38%) and 4 (10.26%). Some of these alterations were identified by the clinical suspicion of their specific syndromes (Wolf-Hirschhorn, Prader-Willi, Williams-Beuren, Miller-Dieker, etc), and this could somehow bias their frequencies (see Table 3). In addition, some other unexpected microdeletion syndromes were detected such as two cases with microdeletion 1p36, one case with each of the following microdeletions: 2q23.1, 5q31, and a deletion 12q13.3-q21.2, including the region of the known microdeletion syndrome 12q14, but it is possible that may be other not hitherto identified.

To our knowledge, this study represents the first one analyzing the frequency of chromosomal alterations globally and by each one of the 23 chromosomes on a consecutive series of newborn infants with congenital defects which are detectable during the first three days of life. It is also remarkable that all the cases were studied with the same protocol and the same team of specialists.

Palabras clave/Key words: Alteraciones cromosómicas estructurales, distribución, cromosomas, ECEMC / Structural chromosomal alterations, distribution, chromosomes, ECEMC.

INTRODUCCIÓN

A partir del año 1971 las técnicas de bandeo cromosómico se transformaron en la técnica citogenética estándar, ya que permitía detectar alteraciones estructurales mucho más pequeñas que con la tinción clásica. Son muchísimos los trabajos publicados (y que se siguen publicando) sobre diferentes tipos de alteraciones estructurales, tanto por exceso (duplicaciones) como por defecto (deleciones), referidas a uno o varios cromosomas, incluyendo las producidas *de novo* y derivadas de alteraciones balanceadas de origen parental¹⁻⁶. En algunos trabajos se han estudiado los tipos de anomalías cromosómicas y sus frecuencias en series de pacientes de distintas procedencias, así como en casos de diagnóstico prenatal⁷⁻⁸, o de revisiones de la literatura⁹⁻¹⁰. Sin embargo, no hemos identificado trabajo alguno que analizara una muestra de recién nacidos consecutivos con defectos congénitos (mayores y/o menores) identificados al nacimiento, para calcular la frecuencia de los diferentes tipos de alteraciones identificadas en cada cromosoma y sus potenciales diferencias.

En este trabajo se muestran los resultados obtenidos en el laboratorio del ECEMC, sobre los recién nacidos con defectos congénitos que integran la base de datos del propio registro. El objetivo es analizar la frecuencia de alteraciones cromosómicas estructurales no balanceadas en cada cromosoma, con especial referencia a las pérdidas y ganancias como única alteración del cariotipo ("puras"), independientemente del mecanismo por el que se hayan producido.

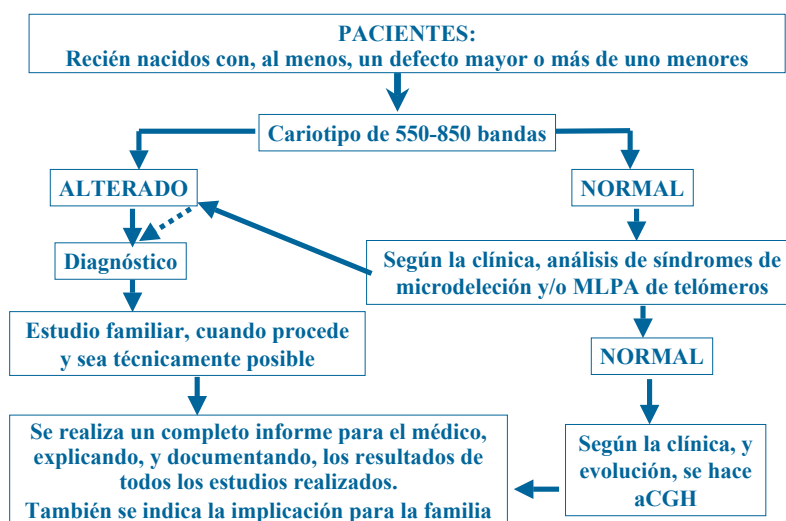
MATERIAL Y MÉTODOS

El procedimiento que se sigue en el laboratorio del ECEMC, se basa en el siguiente protocolo (**Esquema 1**). De los recién nacidos que presenten, al menos, un defecto congénito mayor (generalmente grave), y dos o más defectos congénitos menores y/o leves (incluyendo el bajo peso para la edad gestacional y la hipotonía), se debe enviar sangre y/o tejidos al laboratorio. Una vez recibidas las muestras biológicas, el orden de procesos que se sigue es el siguiente:

1. Se realiza el estudio cromosómico de alta resolución (550-850 bandas).
2. Si el cariotipo fuera normal, pero las manifestaciones clínicas sugieren alguno de los síndromes de microdelección o de otro tipo (de los que existen sondas específicas), se estudian mediante las sondas de FISH o MLPA correspondientes.
3. Si lo anterior resulta normal y, más aún, si se sabe que tiene problemas del desarrollo neuro-motor, se realiza el estudio de las regiones subteloméricas mediante MLPA para tratar de descartar microdeleciones a ese nivel.
4. Finalmente, si lo anterior también fue normal, se sugiere la realización de un estudio de array-CGH (aCGH).
5. Si se detecta una alteración, se realiza el estudio de los padres, hermanos y otros familiares, si procede.

El laboratorio del ECEMC se inició en el año 1981 y, desde esa fecha hasta diciembre del año 2009, se ha realizado el estudio citogenético en 4.681 casos, que corresponden sólo a niños con defectos congénitos que integran la base de datos del ECEMC. No obstante, como las técnicas de FISH se iniciaron en el laboratorio en el año 1995, aunque los resultados que se muestran en este trabajo se han obtenido sobre el total de casos, también se reflejan los datos, y sus diferencias, en los dos periodos formados por el comprendido entre los años 1981-1994, en los que sólo se realizaban análisis de citogenética, y el 1995-2009, en el que ya se usaban también técnicas de FISH.

Esquema 1. Protocolo que se sigue en el ECEMC para la identificación de alteraciones cromosómicas como causa de defectos congénitos

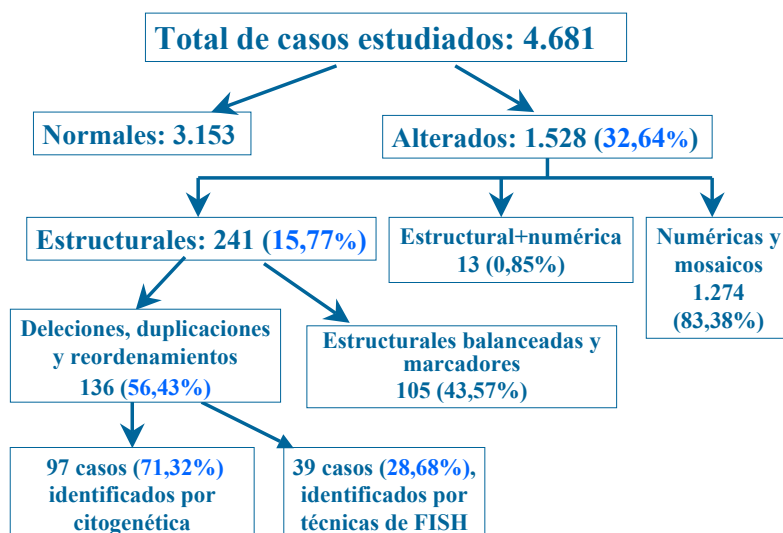


Para el análisis se han calculado los porcentajes de los diferentes tipos de alteraciones estructurales detectadas en los 136 casos, tanto en forma global como por cada uno de los cromosomas, especificando las que afectaron al brazo corto (p) y al brazo largo (q). El cálculo de los porcentajes se ha realizado en forma separada según si la alteración se detectó con bandas o si fue con técnicas de FISH, y en el total. Para las comparaciones se ha calculado la frecuencia relativa (FR), que se obtiene dividiendo los porcentajes que se desean comparar, y cuyo resultado indica las veces que uno de ellos es mayor (o menor) que el otro. El análisis de la ji-cuadrado de la tabla 2x2, nos da el nivel de significación estadística, que se ha establecido a partir de $p < 0,01$. Este análisis permite confirmar si las frecuencias de alteración de cada cromosoma, y las que afectan a cada brazo, difieren como cabría esperar, entre las dos técnicas, y cuáles son los cromosomas en los que con mayor frecuencia se observaron alteraciones estructurales que se detectan en los fetos que llegan a nacer.

RESULTADOS

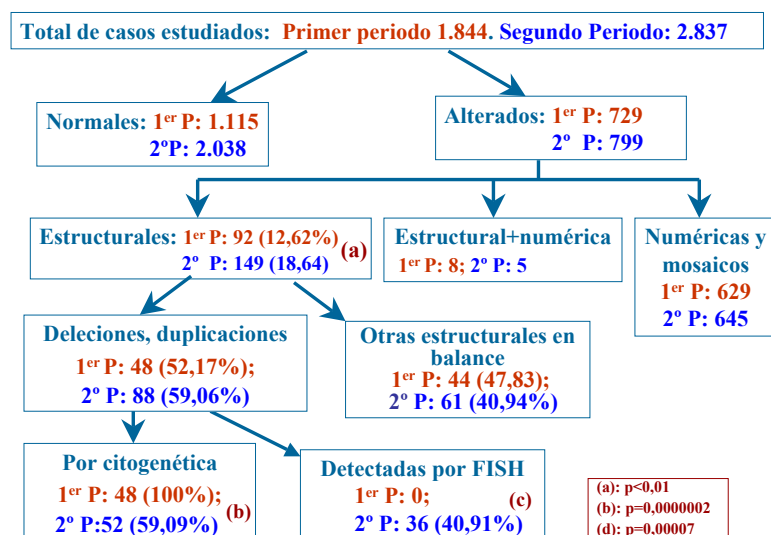
Del total de los 4.681 pacientes estudiados en todo el periodo (**Esquema 2**), en 1.528 (32,64%) se identificaron alteraciones cromosómicas que, como se observa en el **Esquema 2**, se separaron según el tipo de alteración en tres grupos: los 1.274 casos con anomalías numéricas (que representan el 83,38% de los casos con alteraciones cromosómicas), 241 casos (15,77%) con alteraciones estructurales, y un pequeño grupo que incluye 13 casos (0,85%) que presentan a la vez una alteración numérica y una estructural (fundamentalmente son trisomía 21, o monosomía X, que además tienen una alteración estructural de otro cromosoma, que puede estar en balance o en desbalance). Por último, el grupo con alteraciones estructurales se separó en los 105 casos que tenían alteraciones balanceadas de cualquier tipo (43,57% del total de estructurales), y los 136 casos restantes (excluyendo los que tenían alteraciones de los cromosomas sexuales) (56,43%) tenían alteraciones estructurales desbalanceadas. Estas últimas se separaron en 97 casos (71,32%) en los que la alteración se identificó por citogenética (alta resolución), y 39 (28,68%) en los que se detectó por FISH (incluyendo sondas de regiones específicas, MLPA y pintado cromosómico-WCP).

Esquema 2. Muestra estudiada (período 1981-2009) por resultados y técnicas



Con objeto de cuantificar las diferencias introducidas por el periodo en que se utilizan las técnicas de FISH, se hizo la misma distribución en dos periodos de tiempo: el primero que corresponde a los años 1981-1994 y el segundo desde que se empezaron a utilizar dichas técnicas, que corresponde al periodo 1995-2009 (Esquema 3). Como era de esperar, las diferencias entre los dos periodos, que son estadísticamente significativas, se corresponden con una mayor frecuencia de detección de alteraciones estructurales cuando se utilizan técnicas de FISH, esencialmente para los síndromes de microdelección. No obstante, es de destacar que durante el primer periodo se detectaron por citogenética deleciones y duplicaciones en el 48% de los casos con alteraciones estructurales. Una vez expuestos estos resultados, los siguientes análisis que se muestran se han realizado considerando globalmente los datos correspondientes a todo el periodo.

Esquema 3. Muestra estudiada en dos periodos de tiempo por resultados y técnicas



En la Tabla 1 se indican los tipos de alteraciones detectadas en los 97 casos diagnosticados mediante citogenética de alta resolución, distribuidas por cromosomas. En la primera columna se indican los cromosomas por su número; la segunda columna se

refiere a las deleciones observadas en cada cromosoma indicando si afectan al brazo corto o al largo; la tercera columna incluye las duplicaciones, indicando también si afectan al brazo corto o al largo; la cuarta y quinta columnas incluyen las alteraciones derivadas de diferentes reordenamientos cromosómicos (translocaciones no robertsonianas, reordenamientos complejos y anillos, así como las derivadas de inversiones e inserciones). La última columna indica el total de alteraciones estructurales observadas en cada uno de los cromosomas. En ella se puede apreciar que mediante el estudio citogenético de alta resolución se han observado alteraciones estructurales en todos los cromosomas, salvo en el cromosoma 20.

Tabla 1. Distribución de los tipos de alteraciones estructurales identificadas por citogenética, en cada cromosoma

Cromosomas autosómicos	CITOGENÉTICA						N.º total de alteraciones por citogenética
	Tipos y número de alteraciones identificadas						
	Deleciones		Duplicaciones		Derivados de translocación no robertsoniana y reordenamientos complejos, anillos	Derivados inversión, inserción, Ind/dup,	
p-	q-	p+	q+				
1	1	0	0	1	0	0	2
2	2	3	1	2	0	2	10
3	0	0	0	0	1	0	1
4	7	1	2	2	0	1	13
5	7	1	0	0	3	2	13
6	0	2	1	1	1	0	5
7	0	1	0	0	0	0	1
8	0	0	1	0	1	2	4
9	3	0	0	0	1	0	4
10	2	1	0	1	1	2	7
11	0	0	0	0	1	1	2
12	0	0	0	0	2	0	2
13	0	2	0	0	0	0	2
14	0	0	0	0	2	0	2
15	0	0	0	2	1	0	3
16	0	0	1	0	0	0	1
17	0	0	1	1	2	0	4
18	0	4	0	1	2	1	8
19	0	0	0	0	0	1	1
20	0	0	0	0	0	0	0
21	0	0	0	1	1	3	5
22	0	3	0	0	1	0	4
TOTAL N.º	22	18	7	12	20	15	94
%	23,40	19,15	7,45	12,77			
%	42,55		20,22		21,28	15,96	100%
Cromosoma X	0	1	0	0	0	0	1
Cromosoma Y	0	1	0	0	1	0	2
Gran TOTAL	23	22	7	10	24	14	97

En los totales de la parte inferior de las columnas de la [Tabla 1](#), se observa que la frecuencia total de deleciones es del 42,55%, y la de duplicaciones del 20,22%, lo que ofrece una FR=2,10, que es estadísticamente significativa ($p<0,003$). Es decir, que en recién nacidos con defectos congénitos a los que se ha realizado estudio citogenético de alta resolución, se observan el doble de deleciones que de duplicaciones. Si se consideran sólo las alteraciones de los brazos cortos (p) de todos los cromosomas, se observa que la

deleción se detectó en el 23,40%, de los casos, y la duplicación del brazo corto se presentó en el 7,45%, lo que supone una $FR=3,14$ ($p<0,002$). Esto indica, que en los niños recién nacidos con defectos congénitos, las deleciones de los brazos cortos de los cromosomas, son 3 veces más frecuentes que las duplicaciones de los mismos, siendo el resultado estadísticamente significativo ($p<0,003$). Por el contrario, las deleciones de los brazos largos sólo superan a las duplicaciones en 1,5 veces, una diferencia que no es estadísticamente significativa ($p=0,23$). De esta tabla es de destacar la alta frecuencia de alteraciones observadas en los cromosomas 2, 4 y 5. Para los cromosomas 3, 7, 16 y 19 sólo se identificaron alteraciones en un caso, respectivamente.

Tabla 2. Distribución de los tipos de alteraciones estructurales identificadas por FISH en cada cromosoma

Cromosomas autosómicos	FISH: Tipos y números de alteraciones					N.º Total de alteraciones por FISH
	Deleciones		Duplicaciones		Derivados de translocación no robertsoniana, o inserción, anillos	
	p-	q-	p+	q+		
1	2	—	—	—	—	2
2	—	—	—	—	—	—
3	—	—	—	—	—	—
4	2	1	—	—	1	4
5	1	—	—	1	1	3
6	—	—	—	—	—	—
7	—	2	—	—	—	2
8	—	—	—	—	—	—
9	—	—	—	—	1	1
10	—	—	—	—	—	—
11	—	1	—	—	—	1
12	—	—	—	—	—	—
13	—	1	—	1	—	1
14	—	—	—	—	—	—
15	—	5	—	—	1	6
16	—	—	—	—	—	—
17	2	—	—	—	1	3
18	—	—	—	—	—	—
19	—	—	—	—	—	—
20	—	—	—	—	1	1
21	—	—	—	—	—	—
22	—	15	—	—	—	15
	7	24	—	2	6	39
Total	31		2			
%	79,49%		5,13%		15,38%	100%
Cromosoma X	—		—		0	0
Cromosoma Y	—		—		0	—
Gran TOTAL	31		2		6	39

En la [Tabla 2](#), que tiene la misma estructura que la anterior, se muestran los mismos datos pero referidos a las alteraciones detectadas por técnicas de FISH, utilizadas tanto para detección de microdeleciones intersticiales como de alteraciones de las regiones subteloméricas. Los resultados del cálculo de las FR también muestran que las deleciones (79,49%) son 15,49 veces más frecuentes que las duplicaciones (5,13%), y que esa diferencia es estadísticamente muy significativa ($p=0,0000001$). Sin embargo, al contrario de lo que se observa en la [Tabla 1](#), las deleciones del brazo largo (q), son 3,29 veces más frecuentes ($p<0,0002$) que las del brazo corto (p). No obstante, estos resultados están fuertemente influidos por los resultados de la microdeleción 22q11.2, que representa el 38,46% de todas

las alteraciones de la [Tabla 2](#), y la delección del cromosoma 15q asociada al síndrome de Prader-Willi. La alta frecuencia que se observa de la microdelección del brazo largo del cromosoma 22 se debe también a que en el ECEMC se suele analizar esa zona (con FISH) en los niños con cardiopatías congénitas que tienen cromosomas de alta resolución normales. De la misma forma, también se aplican las sondas comercializadas para el estudio de otros síndromes de microdelección cuando se sospechan por la clínica o por los resultados de citogenética. El resto de las alteraciones de la [Tabla 2](#) son mayoritariamente debidas a la aplicación de FISH o MLPA de las regiones subteloméricas, sin sospecha previa de una alteración determinada. En este punto es importante comentar que en este análisis no se han incluido los resultados que corresponden a variantes consideradas polimorfismos, como, por ejemplo, la que afecta a la región subtelomérica del cromosoma 2q.

La [Tabla 3](#) incluye el total de casos en los que se identificaron alteraciones estructurales en cada cromosoma, separados por los dos tipos de técnicas utilizadas, así como el total, junto con sus respectivos porcentajes. Estos datos muestran no sólo los cromosomas en los que se observó mayor frecuencia de alteraciones, sino su relación con la técnica utilizada. Así, en la columna del total se aprecia, en primer lugar, que se han detectado alteraciones en todos los cromosomas. La mayor frecuencia se observa en el cromosoma 22 (13,97%), seguida por los cromosomas 4 (12,50%) y 5 (11,74%), y es también destacable, que las alteraciones del cromosoma 2 (no polimórficas) representan el 4.º lugar (7,35%) en orden de frecuencia de esta columna.

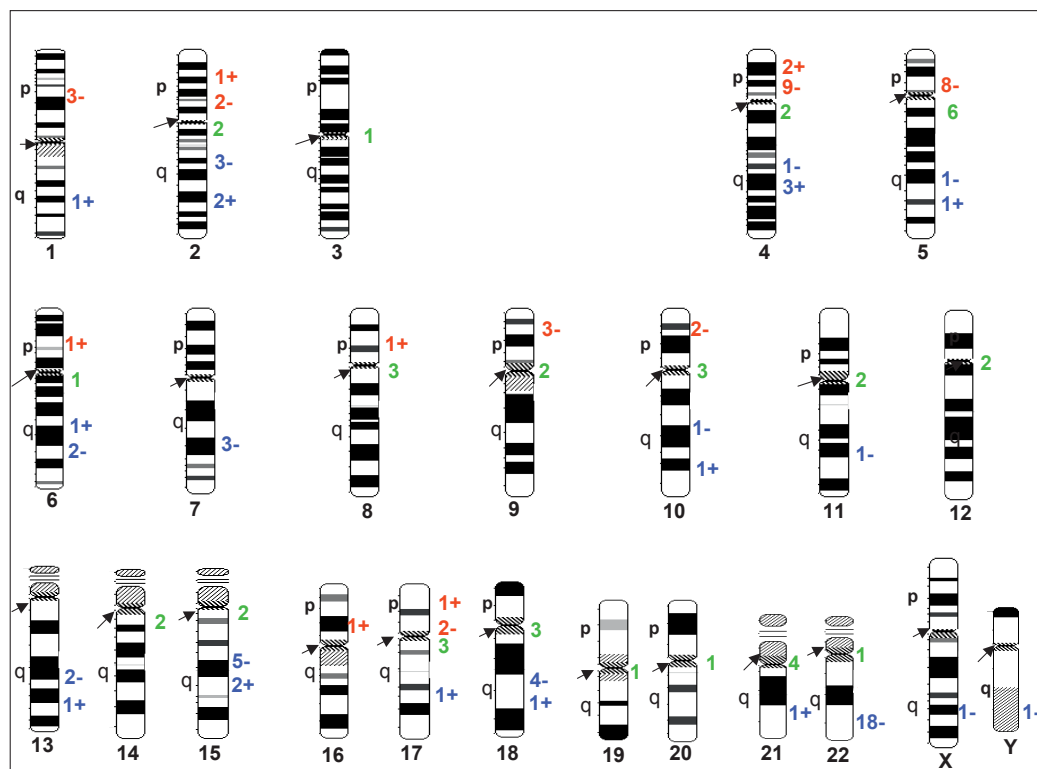
Tabla 3. Frecuencias de las alteraciones estructurales por cromosoma y por tipo de técnica utilizada

	N.º Total de alteraciones por citogenética		Alteraciones detectadas por FISH		TOTAL	
	N.º	%	N.º	%	N.º	%
1	2	2,12	2	5,13	4	2,94
2	10	10,63	0	—	10	7,35
3	1	1,06	0	—	1	0,73
4	13	13,83	4	10,26	17	12,50
5	13	13,83	3	7,69	16	11,74
6	5	5,31	0	—	5	3,68
7	1	1,06	2	5,13	3	2,21
8	4	4,25	0	—	4	2,94
9	4	4,25	1	2,56	5	3,68
10	7	7,44	0	—	7	5,15
11	2	2,12	1	2,56	3	2,21
12	2	2,12	0	—	2	1,47
13	2	2,12	1	2,56	3	2,21
14	2	2,12	0	—	2	1,47
15	3	3,19	6	15,38	9	6,62
16	1	1,06	0	—	1	0,73
17	4	4,25	3	7,69	7	5,15
18	8	8,51	0	—	8	5,88
19	1	1,06	0	—	1	0,73
20	0	—	1	2,56	1	0,73
21	5	5,32	0	—	5	3,68
22	4	4,25	15	38,46	19	13,97
TOTAL N.º	94	100	39	100	136	100
Cromosoma X	1		0		1	
Cromosoma Y	2		0		2	
Gran TOTAL	97		39		139	

Sin embargo, el orden de frecuencias no es igual en cada técnica utilizada; con el análisis de citogenética de alta resolución, los tres cromosomas más frecuentemente alterados, en orden decreciente, son: el 4 y 5 que tienen la misma frecuencia y representa el 13,83% del total; el segundo lugar corresponde al cromosoma 2 (10,63%) y en tercer lugar el cromosoma 18 (8,51%). Mediante técnicas de FISH la máxima frecuencia es la ya comentada del cromosoma 22 (38,46%), y le siguen muy de lejos el cromosoma 15 (15,38%) y el cromosoma 4 (10,26%). Sin tener en cuenta los cromosomas 22, 4 y 5, como cabría esperar tras el uso de las técnicas de FISH, los porcentajes más altos de esta columna corresponden a los cromosomas en los que se encuentran los síndromes de microdelección más frecuentes y mejor conocidos. Entre ellos, las alteraciones detectadas en los cromosomas 7, 15 y 17, que son las siguientes: los dos casos con el cromosoma 7 alterado corresponden al síndrome de Williams-Beuren (delección 7q11.23), seis de los casos con alteración del cromosoma 15 son síndrome de Prader-Willi (delección 15q11-q13), y los tres del 17 son Miller-Dieker (delección 17p13.3), algunos de los cuales fueron analizados por sospecha clínica. Por tanto, sus frecuencias muy posiblemente pueden estar sobreestimadas porque se aplicó el análisis específico para esos síndromes tras la sospecha clínica. Otros resultados del estudio con FISH, como por ejemplo, los de los cromosomas 11 y 13, fueron detectados mediante el análisis de las regiones subteloméricas (11q- y 13q+).

En la columna del total de la [Tabla 3](#), también se aprecia que, cuando se analizan juntos los resultados por citogenética y por técnicas de FISH, se detectaron alteraciones en todos los cromosomas, incluidos los cromosomas sexuales. Los únicos cromosomas para los que se observó un solo paciente con alteración en cada uno tras el estudio citogenético fueron: los cromosomas 3, 16, 19 y 20 (consistente este último en una duplicación derivada de una translocación).

Figura 1. Distribución de las duplicaciones y delecciones detectadas en cada cromosoma (según [Tablas 1 y 2](#)). En rojo se representan las que afectan al brazo corto y en azul las del brazo largo, el signo + indica duplicación y el - delección. En verde se indican el resto de alteraciones por derivados. Las flechas indican los centrómeros.



En cuanto a las alteraciones de los cromosomas 4 y 5, hay que comentar que mientras todos los casos con alteraciones en el brazo corto de esos dos cromosomas detectados por citogenética (Tabla 1) corresponden a los síndromes 4p- y 5p- (Wolf-Hirschhorn y Cri-du-Chat, respectivamente), no lo son todos los identificados por FISH ni se detectaron por sospecha clínica de esos síndromes. Así, en los cuatro niños en los que por FISH se detectaron alteraciones en el cromosoma 4, dos tenían deleciones subteloméricas (4p- y 4q-), un caso presentaba una deleción terminal del brazo corto que incluía la parte final de la región del síndrome de Wolf-Hirschhorn, y el otro caso es un derivado de una translocación de origen paterno. De los tres casos con alteraciones del cromosoma 5 detectados por FISH, uno tenía el síndrome de Cri-du-chat, otro una duplicación 5q31-qter, observada por citogenética, que se confirmó mediante un pintado completo del cromosoma, y el tercero derivado de una translocación 5-11.

Por último, en la Figura 1, que muestra los ideogramas de cada cromosoma, se indica el número de casos que presentan alteraciones en cada cromosoma. Con color rojo se identifican las que afectan al brazo corto y con azul las del brazo largo. Un signo “+” indica exceso y un signo “-” defecto. Por último, con un número verde se indican otros reordenamientos independientemente del brazo al que afecten. De esta forma, se pueden visualizar los tipos de alteraciones y su cantidad, que se han detectado en cada cromosoma.

DISCUSIÓN

Dada la alta resolución de las nuevas técnicas de citogenética molecular, son muchos los trabajos en los que se vienen describiendo diferentes alteraciones estructurales submicroscópicas, por lo que sería muy prolijo enumerarlos. En algunos se ofrecen cifras de porcentajes calculadas sobre diferentes series de pacientes seleccionados por distintas características como: estudios de diagnóstico prenatal por diferentes causas^{7-8,11-13}, en productos de interrupciones voluntarias de la gestación y/o necropsias por defectos fetales^{14,15}, en cribados de las regiones subteloméricas de pacientes con retraso mental¹⁶ y en estudios de metanálisis sobre trabajos publicados¹⁷, entre otros, de los que se hace referencia a algunos de los más recientes en este artículo.

En general, las frecuencias de alteraciones estructurales que se ofrecen en los distintos trabajos presentan magnitudes muy diferentes, y tamaños de muestras muy variables, aunque generalmente muy pequeños, siendo lo más habitual ofrecer las frecuencias por tipo de alteración, como duplicaciones, deleciones, anillos o por el nombre del síndrome (Prader-Willi, Miller-Dieker...). Últimamente, se está produciendo un incremento casi exponencial del número de artículos en los que se describen nuevas alteraciones submicroscópicas y síndromes de microdeleción y de microduplicación¹⁸. Con frecuencia, estos estudios tienen deficiencias debidas a la selección de los casos, a la inclusión de casos con diferentes edades, así como a la variabilidad en la terminología y descripción clínica que presentan. Estos aspectos son especialmente importantes, porque no sólo pueden estar influidos por las edades de los pacientes, sino por el detalle con el que se realizan las descripciones clínicas, y por la habilidad y experiencia de los profesionales que realizan la exploración y descripción de los pacientes.

No hemos encontrado trabajo alguno sobre la frecuencia de alteraciones cromosómicas analizadas en series consecutivas de recién nacidos con defectos congénitos, o sobre otros tipos de series no sesgadas, que analicen las alteraciones para cada cromosoma. No obstante, esto no es extraño, ya que no es fácil estudiar una población no sesgada y suficientemente grande, para detectar alteraciones cromosómicas que son muy poco frecuentes. En el ECEMC, la muestra que analizamos es sobre recién nacidos consecutivos con defectos congénitos, y todos los casos han sido estudiados con el mismo sistema, y por los mismos profesionales. Además, como se realiza en recién nacidos que presentan alteraciones del desarrollo prenatal, resulta muy eficaz y efectivo desde el punto de vista sanitario, ya que la causa más frecuente de las alteraciones del desarrollo son precisamente las anomalías

cromosómicas. En nuestros datos, de un total de 8.390 niños en los que se llegó a identificar la causa de sus defectos, incluyendo todos los tipos de factores causales (genéticos, cromosómicos y ambientales), el 41,33% fueron causados por alteraciones cromosómicas.

Una de las dificultades y de las potenciales deficiencias que puede tener el análisis de nuestros datos es que no se recibieron muestras de todos los casos del ECEMC que cumplían el criterio para ser objeto de estudio citogenético. También cabe la posibilidad de que la presencia de algunos rasgos clínicos hiciera sospechar al pediatra-neonatólogo que pudiera tener alguno de los síndromes de microdelección, y se seleccionen más esos pacientes para la realización del estudio cromosómico. Igualmente, es posible que en los recién nacidos con malformaciones y/o defectos congénitos graves que nacen muertos o mueren al nacer sea más fácil no recoger muestras para estudio cromosómico. No obstante, y teniendo presentes estas limitaciones, los resultados que se muestran en este trabajo representan una aproximación al análisis de la frecuencia con la que se observan alteraciones en cada uno de los cromosomas, en niños recién nacidos consecutivos con defectos congénitos. Unos resultados que, con las técnicas utilizadas, muestran que las alteraciones de la estructura de cada cromosoma no tienen la misma frecuencia al nacimiento. Además, se han separado las deleciones y duplicaciones que consideramos “puras”, de las que proceden de reordenamientos cromosómicos. Esto ha permitido confirmar y cuantificar también, que esas deleciones son más frecuentes que las duplicaciones en niños con anomalías congénitas. Un resultado conocido, aunque no previamente cuantificado con estas técnicas, y que se ha empezado cuantificar en estudios recientes con técnicas moleculares en los gametos masculinos. Previamente, se habían elaborado algunas hipótesis, como la dificultad para su identificación, ya que tecnológicamente era más fácil detectar las microdeleciones con técnicas de FISH que las microduplicaciones. No obstante, con la generalización del uso del aCGH, esa dificultad disminuye drásticamente y, de hecho, ya se está produciendo un incremento espectacular en la detección de microduplicaciones. Otra de las dificultades se basa en que las manifestaciones clínicas de las microduplicaciones tienden a ser menos graves que sus recíprocas microdeleciones. Para los interesados en estos aspectos, en un número de la revista *Am J Med Genet* publicado en el año 2010, se incluye una sección especial sobre los síndromes de microdelección, constituida por una Introducción y cuatro artículos cuya referencia, incluyendo las páginas de los cinco es: *Am J Med Genet* 2010; 152A:1.063-1.110.

Cabe la posibilidad de que algunas alteraciones de ciertos cromosomas sean más letales que otras, lo que explicaría muchas de las diferencias entre ellos. Incluso, que en un pequeño grupo de cromosomas sólo se observen, y con muy baja proporción, alteraciones que con mayor frecuencia no son “puras”. Por ejemplo, en los cromosomas 3, 16, 19 y 20 (Tabla 3), para los que sólo se identificó un caso respectivamente, sus alteraciones se debían a: en el cromosoma 3 se trataba de un derivado de translocación; en el 19 un derivado de inserción de origen materno, y en el 20 un derivado de translocación; sólo en el cromosoma 16 se observó un exceso en el brazo corto. No obstante, cabe también la posibilidad de que en los cromosomas con menos alteraciones, éstas sean de mucho menor tamaño y no se detecten con las técnicas utilizadas. Una posibilidad que, en cierto modo, se ve apoyada por los resultados que se están publicando de estudios realizados con array-CGH¹⁸⁻²⁰. De hecho, y aunque estas técnicas aún presentan algún problema de interpretación, está habiendo un gran incremento de publicaciones sobre microdeleciones patológicas detectadas por array-CGH.

Dado que durante los últimos años se vienen reconociendo cada vez más síndromes de microdelección y microduplicación, en el Cuadro 1 se indican los más reconocidos de la literatura, incluyendo también los que se encuentran en la base de datos DECIPHER (*Database Chromosomal Imbalances and Phenotype in Humans*) (<https://decipher.sanger.ac.uk>) como síndromes de microdelección y microduplicación.

Cuadro 1. Síndromes de microdeleción/duplicación descritos

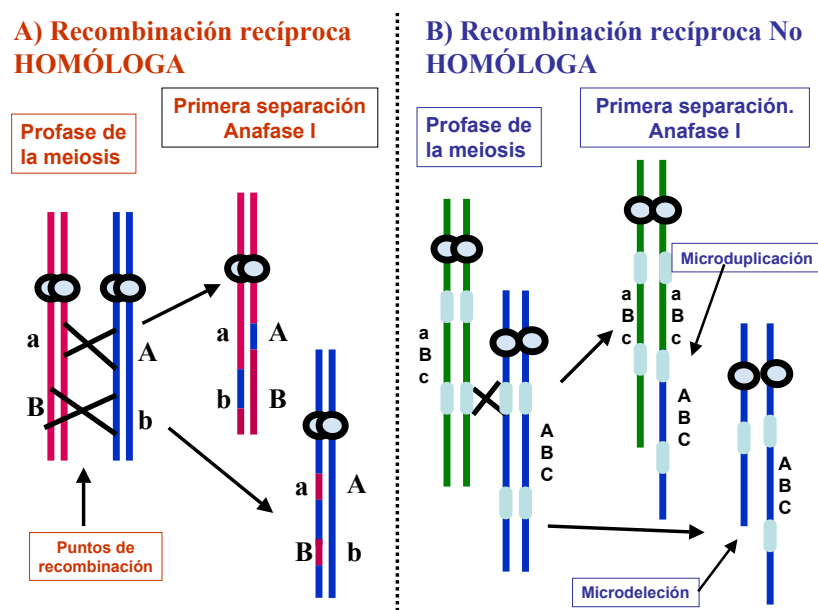
Cromosoma y región	Referencias
1p36-	21, 32, 33
1q14-42-	21
2p15-16.1-	34,35
2q23.1-	18, 23,24
2q31.1-	22,
3q24-25	36
3q29-/+	37, 38
4p14-p15.32-	39
4q21-	40
5q12.1-	41
5q31.3-	25, 26, 42
6q14.1-q15 -	43
6q25.3-29.3-	44
7q12.23-/+	45,
8p12-21-	46, 47
8p23.1-	48
9q22.32+	49, 50
9q34-	27, 51
10p11.12	52
10q22-23-/+	53
12q14-	54, 55
13q21-	56
14q-	57,
15q11.2-/15q13.3	58, 59, 60
15q24-	61, 62
16p11.2-12.2+	63, 64
16p13.3+	65
17p13.3-/+	66, 67
17q12-	68, 69
17q21.31-	70
18q21.2q21.33	71, 72
19q13.11+	73

Tras la revisión de la literatura, podemos considerar que de las alteraciones estructurales que se han identificado en los casos del ECEMC incluidas en las [tablas 1 y 2](#), los tres casos con deleciones 1p tienen en realidad un síndrome ya reconocido como de microdeleción 1p36²¹⁻²². Dos de los tres casos en los que el cromosoma 2 presenta una deleción del brazo largo, uno es un síndrome de microdeleción 2q23.1²³ y, muy posiblemente, el otro sea un síndrome de microdeleción 2q33.1²⁴. Del total de alteraciones del cromosoma 5, el único caso que presenta una deleción 5q corresponde al síndrome de microdeleción 5q31²⁵⁻²⁶, y aunque la deleción en nuestro caso es más grande al afectar a la región q23.1-q32, es igual a la de alguno de los siete casos con este síndrome de microdeleción descritos en la literatura hasta la fecha²⁶. Por último, las dos únicas alteraciones que hemos identificado en el cromosoma 12 son derivadas de una translocación, y una de ellas afecta al brazo largo, concretamente a la región 12q13.3-21.2, que incluye la zona del síndrome de microdeleción 12q14²⁷, por lo que podría encuadrarse entre los diferentes tamaños de la microdeleción de este síndrome. Estos siete casos que se pueden considerar síndromes de microdeleción, y que no se sospecharon previamente, representan el 5,15% de las alteraciones estructurales no balanceadas. Además, cinco de los siete casos fueron identificados por citogenética de alta resolución, aunque esta posibilidad va a depender del tamaño que tenga la región afectada y de la mayor resolución que se logre en el estudio.

Desde la identificación de la gran cantidad de variaciones en el número de copias ganadas y perdidas (llamadas CNV de sus siglas en inglés *Copy Number Variations*) que contiene el genoma humano²⁸, que se consideran como polimorfismos, han sido numerosos los estudios realizados sobre estas variaciones tanto para tratar de dilucidar su función, como para determinar si sus cambios se relacionan con efectos patológicos.

Aunque estos aspectos quedan fuera del objetivo de este trabajo, es importante comentar brevemente que ya se ha identificado que ciertas CNV pueden afectar la expresión génica, tanto de genes localizados en su misma zona como en las zonas adyacentes²⁹⁻³⁰. En este sentido, es de destacar que ciertas zonas flanqueadas por algunos tipos de CNV son susceptibles de producir deleciones y duplicaciones. Es más, uno de los mecanismos de producción de microdeleciones y microduplicaciones (y sus respectivos síndromes) es que se produzcan recombinaciones no homólogas que se ven favorecidas en las regiones que están flanqueadas por algunos tipos de CNV³¹. Estos tipos de recombinaciones no homólogas producen, por un lado, una microdelección, y por otro, su recombinación recíproca dará lugar a una microduplicación (Figura 2). Además, se puede apreciar en el Cuadro 1, en el que las mismas regiones se ven afectadas tanto por su ausencia como por su duplicación.

Figura 2. Esquema de los tipos de recombinación entre cromosomas homólogos. Panel A: recombinación homóloga. Se produce entre partes homólogas de cromosomas homólogos. Panel B: recombinación no homóloga. Se produce entre partes no homólogas de cromosomas homólogos. Estas dan lugar a dos tipos de alteraciones recíprocas: una microdelección y su recíproca microduplicación



Dadas las dificultades que existen para disponer de muestras adecuadas que permitan no sólo la detección de estas pequeñas alteraciones del genoma, sino sus frecuencias y el espectro clínico que producen, en un reciente trabajo Berg y cols.¹⁸, comentan que *una buena y controlada base de datos que recoja en forma uniforme los resultados moleculares y la información clínica, puede tener un gran impacto en la comprensión de estas alteraciones raras*. El grupo del ECEMC cumple ampliamente estos requisitos, aunque se debe insistir en la necesidad de aplicar estrictamente la normativa de realizar el estudio citogenético a todos los casos susceptibles según la definición establecida en el Manual Operacional.

Como conclusión y a la vista de los resultados de este análisis, es necesario insistir en que el estudio de todo niño que presente defectos congénitos (del tipo que sean), se debe empezar por un estudio de citogenética de alta resolución (no menos de 550-850 bandas), y seguir el protocolo indicado en el [esquema 1](#). Esta es la única forma de rentabilizar los recursos, sobre todo mientras que las técnicas nuevas no sean menos costosas de lo que todavía son desde el punto de vista económico.

REFERENCIAS

1. Cyrus C, Kaur H, Koshy T, Thankanadar J, Nallathambi C. A de novo reciprocal t(2;18) translocation with regular trisomy 21. *Genet Test*. 2007;11:459-462.
2. Su PH, Chen JY, Tsao TF, Chen SJ. De novo interstitial deletion of chromosome 2 (p23p24). *Pediatr Neonatol*. 2011;52:46-50.
3. Tyshchenko N, Hackmann K, Gerlach EM, Neuhaus T, Schrock E, Tinschert S. 1.6Mb deletion in chromosome band 3q29 associated with eye abnormalities. *Eur J Med Genet*. 2009;52:128-130.
4. Bonaglia MC, Ciccone R, Gimelli G, Gimelli S, Marelli S, Verheij J, Giorda R, Grasso R, Borgatti R, Pagone F, Rodríguez L, Martínez-Frías ML, Van Ravenswaaij C, Zuffardi O. Detailed phenotype-genotype study in five patients with chromosome 6q16 deletion: narrowing the critical region for Prader-Willi-like phenotype. *Eur J Hum Genet*. 2008;16:1443-1449.
5. MacDonald AH, Rodríguez L, Aceña I, Martínez-Fernández ML, Sánchez-Izquierdo D, Zuazo E, Martínez-Frías ML. Subtelomeric deletion of 12p: description of a third case and review. *Am J Med Genet A*. 2010;152A:1561-1566.
6. Rogers JF. Clinical delineation of proximal and distal partial 13q trisomy. *Clin Genet*. 1984;25:221-229.
7. Cerrillo Hinojosa M, Yerena de Vega MC, González Panzzi ME, Godoy H, Galicia J, Gutiérrez Nájara A. Genetic amniocentesis in high-risk populations. Experience in 3081 cases. *Ginecol Obstet Mex*. 2009;77:173-182.
8. Park SY, Kim JW, Kim YM, Kim JM, Lee MH, Lee BY, Han JY, Kim MY, Yang JH, Ryu HM. Frequencies of fetal chromosomal abnormalities at prenatal diagnosis: 10 years experiences in a single institution. *J Korean Med Sci*. 2001;16:290-293.
9. Kim SS, Jung SC, Kim HJ, Moon HR, Lee JS. Chromosome abnormalities in a referred population for suspected chromosomal aberrations: a report of 4117 cases. *J Korean Med Sci*. 1999;14:373-376.
10. Bateman MS, Mehta SG, Willatt L, Selkirk E, Bedwell C, Zwolinski S, Sparnon L, Simonic I, Abbott K, Barber JC. A de novo 4q34 interstitial deletion of at least 9.3 Mb with no discernible phenotypic effect. *Am J Med Genet A*. 2010;152A:1764-1769.
11. Leung TY, Vogel I, Lau TK, Chong W, Hyett JA, Petersen OB, Choy KW. Identification of submicroscopic chromosomal aberrations in fetuses with increased nuchal translucency and an apparently normal karyotype. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2011 Mar 11. doi: 10.1002/uog.8988. [Epub ahead of print]
12. Evangelidou P, Sismani C, Ioannides M, Christodoulou C, Koumbaris G, Kallikas I, Georgiou I, Velissariou V, Patsalis PC. Clinical application of whole-genome array CGH during prenatal diagnosis: Study of 25 selected pregnancies with abnormal ultrasound findings or apparently balanced structural aberrations. *Mol Cytogenet*. 2010;3:24.
13. Kjaergaard S, Sundberg K, Jørgensen FS, Rohde MD, Lind AM, Gerdes T, Tabor A, Kirchhoff M. Diagnostic yield by supplementing prenatal metaphase karyotyping with MLPA for microdeletion syndromes and subtelomere imbalances. *Prenat Diagn*. 2010;30:995-999.
14. Garne E, Khoshnood B, Loane M, Boyd P, Dolk H; EUROCAT Working Group. Termination of pregnancy for fetal anomaly after 23 weeks of gestation: a European register-based study. *BJOG*. 2010;117:660-666.
15. Wu Y, Ji T, Wang J, Xiao J, Wang H, Li J, Gao Z, Yang Y, Cai B, Wang L, Zhou Z, Tian L, Wang X, Zhong N, Qin J, Wu X, Jiang Y. Submicroscopic subtelomeric aberrations in Chinese patients with unexplained developmental delay/mental retardation. *BMC Med Genet*. 2010;11:72.
16. Hillman SC, Pretlove S, Coomarasamy A, McMullan DJ, Davison EV, Maher ER, Kilby MD. Additional information from array comparative genomic hybridization technology over conventional karyotyping in prenatal diagnosis: a systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2011;37:6-14. Review.
17. Faas BH, Van der Burgt I, Kooper AJ, Pfundt R, Hehir-Kwa JY, Smits AP, De Leeuw N. Identification of clinically significant, submicroscopic chromosome alterations and UPD in fetuses with ultrasound anomalies using genome-wide 250k SNP array analysis. *J Med Genet*. 2010;47:586-594.
18. Berg JS, Potocki L, Bacino CA. Common recurrent microduplication syndromes: Diagnosis and management in clinical practice. *Am J Med Genet* 2010;152A:1066-1078.
19. Shaffer LG, Bejjani BA. Medical applications of array CGH and the transformation of clinical cytogenetics. *Cytogenet Genome Res*. 2006;115:303-309. Review.
20. Ullmann R, Turner G, Kirchhoff M, Chen W, Tonge B, Rosenberg C, Field M, Vianna-Morgante AM, Christie L, Krepischi-Santos AC, Banna L, Brereton AV, Hill A, Bisgaard AM, Müller I, Hultschig C, Erdogan F, Wiczkorek G, Ropers HH. Array CGH identifies reciprocal 16p13.1 duplications and deletions that predispose to autism and/or mental retardation. *Hum Mutat*. 2007;28:674-682.
21. Rosenfeld JA, Crolla JA, Tomkins S, Bader P, Morrow B, Gorski J, Troxell R, Forster-Gibson C, Cilliers D, Hislop RG, Lamb A, Torchia B, Ballif BC, Shaffer LG. Refinement of causative genes in monosomy

- 1p36 through clinical and molecular cytogenetic characterization of small interstitial deletions. *Am J Med Genet A*. 2010;152A:1951-1959.
22. Dimitrov B, Balikova I, De Ravel T, Van Esch H, De Smedt M, Baten E, Vermeesch JR, Bradinova I, Simeonov E, Devriendt K, Fryns JP, Debeer P. 2q31.1 microdeletion syndrome: redefining the associated clinical phenotype. *J Med Genet*. 2011;48:98-104.
 23. Urquhart J, Black GC, Clayton-Smith J. 4.5 Mb microdeletion in chromosome band 2q33.1 associated with learning disability and cleft palate. *Eur J Med Genet*. 2009;52:454-457.
 24. Balasubramanian M, Smith K, Basel-Vanagaite L, Feingold MF, Brock P, Gowans GC, Vasudevan PC, Cresswell L, Taylor EJ, Harris CJ, Friedman N, Moran R, Feret H, Zackai EH, Theisen A, Rosenfeld JA, Parker MJ. Case series: 2q33.1 microdeletion syndrome--further delineation of the phenotype. *J Med Genet*. 2011;48:290-298.
 25. Rosenfeld JA, Drautz JM, Clericuzio CL, Cushing T, Raskin S, Martin J, Tervo RC, Pitarque JA, Nowak DM, Karolak JA, Lamb AN, Schultz RA, Ballif BC, Bejjani BA, Gajacka M, Shaffer LG. Deletions and duplications of developmental pathway genes in 5q31 contribute to abnormal phenotypes. *Am J Med Genet A*. 2011;155:1906-1916.
 26. Shimojima K, Isidor B, Le Caignec C, Kondo A, Sakata S, Ohno K, Yamamoto T. A new microdeletion syndrome of 5q31.3 characterized by severe developmental delays, distinctive facial features, and delayed myelination. *Am J Med Genet A*. 2011;155A:732-736.
 27. Lynch SA, Foulds N, Thuresson AC, Collins AL, Annerén G, Hedberg BO, Delaney CA, Iremonger J, Murray CM, Crolla JA, Costigan C, Lam W, Fitzpatrick DR, Regan R, Ennis S, Sharkey F. The 12q14 microdeletion syndrome: six new cases confirming the role of HMGA2 in growth. *Eur J Hum Genet*. 2011;19:534-539.
 28. Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, Fiegler H, Shapero MH, Carson AR, Chen W, Cho EK, Dallaire S, Freeman JL, González JR, Gratacòs M, Huang J, Kalaitzopoulos D, Komura D, MacDonald JR, Marshall CR, Mei R, Montgomery L, Nishimura K, Okamura K, Shen F, Somerville MJ, Tchinda J, Valsesia A, Woodwark C, Yang F, Zhang J, Zerjal T, Zhang J, Armengol L, Conrad DF, Estivill X, Tyler-Smith C, Carter NP, Aburatani H, Lee C, Jones KW, Scherer SW, Hurles ME. Global variation in copy number in the human genome. *Nature*. 2006;444:444-454.
 29. Merla G, Howald C, Henrichsen CN, Lyle R, Wyss C, Zobot MT, Antonarakis SE, Reymond A. Submicroscopic deletion in patients with Williams-Beuren syndrome influences expression levels of the nonhemizygous flanking genes. *Am J Hum Genet*. 2006;79:332-341.
 30. Rodríguez L, Zollino M, Mansilla E, Martínez-Fernández ML, Pérez P, Murolo M, Martínez-Frías ML. The first 4p euchromatic variant in a healthy carrier having an unusual reproductive history. *Am J Med Genet A*. 2007;143A:995-998.
 31. Chen KS, Manian P, Koeuth T, Potocki L, Zhao Q, Chinault AC, Lee CC, Lupski JR. Homologous recombination of a flanking repeat gene cluster is a mechanism for a common contiguous gene deletion syndrome. *Nat Genet*. 1997;17:154-163.
 32. Saito S, Kawamura R, Kosho T, Shimizu T, Aoyama K, Koike K, Wada T, Matsumoto N, Kato M, Wakui K, Fukushima Y. Bilateral perisylvian polymicrogyria, periventricular nodular heterotopia, and left ventricular noncompaction in a girl with 10.5-11.1 Mb terminal deletion of 1p36. *Am J Med Genet A*. 2008;146A:2891-2897.
 33. Neal J, Apse K, Sahin M, Walsh CA, Sheen VL. Deletion of chromosome 1p36 is associated with periventricular nodular heterotopia. *Am J Med Genet A*. 2006;140:1692-1695.
 34. Chabchoub E, Vermeesch JR, De Ravel T, De Cock P, Fryns JP. The facial dysmorphism in the newly recognised microdeletion 2p15-p16.1 refined to a 570 kb region in 2p15. *J Med Genet*. 2008;45:189-192.
 35. Liu X, Malenfant P, Reesor C, Lee A, Hudson ML, Harvard C, Qiao Y, Persico M, Cohen IL, Chudley AE, Forster-Gibson C, Rajcan-Separovic E, Lewis MS, Holden JJ. 2p15-p16.1 microdeletion syndrome: molecular characterization and association of the OTX1 and XPO1 genes with autism spectrum disorders. *Eur J Hum Genet*. 2011. doi: 10.1038/ejhg.2011.112. [Epub ahead of print]
 36. Willemsen MH, De Leeuw N, Mercer C, Eisenhauer H, Morris J, Collinson MN, Barber JC, Lam ST, Lo IF, Rensen H, Ferwerda A, Hamel BC, Kleefstra T. Further molecular and clinical delineation of the Wisconsin syndrome phenotype associated with interstitial 3q24q25 deletions. *Am J Med Genet A*. 2011;155A:106-112.
 37. Quintero-Rivera F, Sharifi-Hannauer P, Martínez-Agosto JA. Autistic and psychiatric findings associated with the 3q29 microdeletion syndrome: case report and review. *Am J Med Genet A*. 2010;152A:2459-67. Review.
 38. Dasouki MJ, Lushington GH, Hovanes K, Casey J, Gorre M. The 3q29 microdeletion syndrome: Report of three new unrelated patients and in silico "RNA binding" analysis of the 3q29 region. *Am J Med Genet A*. 2011;155:1654-1660.

39. Gawlik-Kuklinska K, Wierzba J, Wozniak A, Iliszko M, Debiec-Rychter M, Dubaniewicz-Wybieralska M, Limon J. Periventricular heterotopia in a boy with interstitial deletion of chromosome 4p. *Eur J Med Genet.* 2008;51:165-1671.
40. Bonnet C, Andrieux J, Béri-Dexheimer M, Leheup B, Boute O, Manouvrier S, Delobel B, Copin H, Receveur A, Mathieu M, Thiriez G, Le Caignec C, David A, De Blois MC, Malan V, Philippe A, Cormier-Daire V, Colleaux L, Flori E, Dollfus H, Pelletier V, Thauvin-Robinet C, Masurel-Paulet A, Faivre L, Tardieu M, Bahi-Buisson N, Callier P, Mugneret F, Edery P, Jonveaux P, Sanlaville D. Microdeletion at chromosome 4q21 defines a new emerging syndrome with marked growth restriction, mental retardation and absent or severely delayed speech. *J Med Genet.* 2010;47:377-384.
41. Jaillard S, Andrieux J, Plessis G, Krepischi AC, Lucas J, David V, Le Brun M, Bertola DR, David A, Belaud-Rotureau MA, Mosser J, Lazaro L, Treguier C, Rosenberg C, Odent S, Dubourg C. 5q12.1 deletion: delineation of a phenotype including mental retardation and ocular defects. *Am J Med Genet A.* 2011;155A:725-731.
42. Shimojima K, Isidor B, Le Caignec C, Kondo A, Sakata S, Ohno K, Yamamoto T. New microdeletion syndrome of 5q31.3 characterized by severe developmental delays, distinctive facial features, and delayed myelination. *Am J Med Genet A.* 2011;155A:732-736.
43. Wentzel C, Lynch SA, Stattin EL, Sharkey FH, Annerén G, Thuresson AC. Interstitial Deletions at 6q14.1-q15 Associated with Obesity, Developmental Delay and a Distinct Clinical Phenotype. *Mol Syndromol.* 2010;1:75-81.
44. Nagamani SC, Erez A, Eng C, Ou Z, Chinault C, Workman L, Coldwell J, Stankiewicz P, Patel A, Lupski JR, Cheung SW. Interstitial deletion of 6q25.2-q25.3: a novel microdeletion syndrome associated with microcephaly, developmental delay, dysmorphic features and hearing loss. *Eur J Hum Genet.* 2009;17:573-581.
45. Okamoto N, Hatsukawa Y, Shimojima K, Yamamoto T. Submicroscopic deletion in 7q31 encompassing CADPS2 and TSPAN12 in a child with autism spectrum disorder and PHPV. *Am J Med Genet A.* 2011;155:1568-1573.
46. Fisch GS, Davis R, Youngblom J, Gregg J. Genotype-phenotype association studies of chromosome 8p inverted duplication deletion syndrome. *Behav Genet.* 2011;41:373-380.
47. Willemsen MH, de Leeuw N, Pfundt R, De Vries BB, Kleefstra T. Clinical and molecular characterization of two patients with a 6.75 Mb overlapping deletion in 8p12p21 with two candidate loci for congenital heart defects. *Eur J Med Genet.* 2009;52:134-139.
48. Barber JC, Maloney VK, Huang S, Bunyan DJ, Cresswell L, Kinning E, Benson A, Cheetham T, Wyllie J, Lynch SA, Zwolinski S, Prescott L, Crow Y, Morgan R, Hobson E. 8p23.1 duplication syndrome; a novel genomic condition with unexpected complexity revealed by array CGH. *Eur J Hum Genet.* 2008;16:18-27.
49. Shimojima K, Yamamoto T, Ignatius J, Knuutila S. 9q22 Deletion - First Familial Case. *Orphanet J Rare Dis.* 2011;6:45.
50. Sigberg L, Peippo M, Sipponen M, Miikkulainen T, Shimojima K, Yamamoto T, Ignatius J, Knuutila S. 9q22 Deletion - First Familial Case. *Orphanet J Rare Dis.* 2011;6:45. [Epub ahead of print]
51. Gawlik-Kuklinska K, Iliszko M, Wozniak A, Debiec-Rychter M, Kardas I, Wierzba J, Limon J. A girl with duplication 9q34 syndrome. *Am J Med Genet A.* 2007;143A:2019-2023.
52. Wentzel C, Rajcan-Separovic E, Ruivenkamp CA, Chantot-Bastaraud S, Metay C, Andrieux J, Annerén G, Gijssbers AC, Druart L, Hyon C, Portnoi MF, Stattin EL, Vincent-Delorme C, Kant SG, Steinraths M, Marlin S, Giurgea I, Thuresson AC. Genomic and clinical characteristics of six patients with partially overlapping interstitial deletions at 10p12p11. *Eur J Hum Genet.* 2011;April 27. [Epub ahead of print]
53. Van Bon BW, Balciuniene J, Fruhman G, Nagamani SC, Broome DL, Cameron E, Martinet D, Roulet E, Jacquemont S, Beckmann JS, Irons M, Potocki L, Lee B, Cheung SW, Patel A, Bellini M, Selicorni A, Ciccone R, Silengo M, Vetro A, Knoers NV, De Leeuw N, Pfundt R, Wolf B, Jira P, Aradhya S, Stankiewicz P, Brunner HG, Zuffardi O, Selleck SB, Lupski JR, de Vries BB. The phenotype of recurrent 10q22q23 deletions and duplications. *Eur J Hum Genet.* 2011;19:400-408.
54. Buysse K, Reardon W, Mehta L, Costa T, Fagerstrom C, Kingsbury DJ, Anadiotis G, McGillivray BC, Hellemans J, De Leeuw N, De Vries BB, Speleman F, Menten B, Mortier G. The 12q14 microdeletion syndrome: additional patients and further evidence that HMGA2 is an important genetic determinant for human height. *Eur J Med Genet.* 2009;52:101-107.
55. Filges I, Röthlisberger B, Noppen C, Boesch N, Wenzel F, Necker J, Binkert F, Huber AR, Heinimann K, Miny P. Familial 14.5 Mb interstitial deletion 13q21.1-13q21.33: clinical and array-CGH study of a benign phenotype in a three-generation family. *Am J Med Genet A.* 2009;149A:237-241.
56. Kirchhoff M, Bisgaard AM, Stoeva R, Dimitrov B, Gillissen-Kaesbach G, Fryns JP, Rose H, Grozdanova L, Ivanov I, Keymolen K, Fagerberg C, Tranebjærg L, Skovby F, Stefanova M. Phenotype and 244k array-CGH characterization of chromosome 13q deletions: an update of the phenotypic map of 13q21.1-qter. *Am J Med Genet A.* 2009;149A:894-905.

57. Torgykes E, Shanske AL, Anyane-Yeboah K, Nahum O, Pirzadeh S, Blumfield E, Jobanputra V, Warburton D, Levy B. The proximal chromosome 14q microdeletion syndrome: Delineation of the phenotype using high resolution SNP oligonucleotide microarray analysis (SOMA) and review of the literature. *Am J Med Genet A*. 2011 Jul 8. doi: 10.1002/ajmg.a.34090. [Epub ahead of print]
58. Von der Lippe C, Rustad C, Heimdal K, Rødningen OK. 15q11.2 microdeletion - seven new patients with delayed development and/or behavioural problems. *Eur J Med Genet*. 2011;54:357-360.
59. Sempere Pérez A, Manchón Trives I, Palazón Azorín I, Alcaraz Más L, Pérez Lledó E, Galán Sánchez F. 15Q11.2 (BP1-BP2) microdeletion, a new syndrome with variable expressivity. *An Pediatr (Barc)*. 2011;75:58-62.
60. Masurel-Paulet A, Andrieux J, Callier P, Cuisset JM, Le Caignec C, Holder M, Thauvin-Robinet C, Doray B, Flori E, Alex-Cordier MP, Beri M, Boute O, Delobel B, Dieux A, Vallee L, Jaillard S, Odent S, Isidor B, Beneteau C, Vigneron J, Bilan F, Gilbert-Dussardier B, Dubourg C, Labalme A, Bidon C, Gautier A, Pernes P, Pinoit JM, Huet F, Mugneret F, Aral B, Jonveaux P, Sanlaville D, Faivre L. Delineation of 15q13.3 microdeletions. *Clin Genet*. 2010;78:149-161.
61. Van Esch H, Backx L, Pijkels E, Fryns JP. Congenital diaphragmatic hernia is part of the new 15q24 microdeletion syndrome. *Eur J Med Genet*. 2009;52:153-156.
62. Roetzer KM, Schwarzbraun T, Obenaus AC, Hauser E, Speicher MR. Further evidence for the pathogenicity of 15q24 microduplications distal to the minimal critical regions. *Am J Med Genet A*. 2010;152A:3173-3178.
63. Battaglia A, Novelli A, Bernardini L, Iglizzi R, Parrini B. Further characterization of the new microdeletion syndrome of 16p11.2-p12.2. *Am J Med Genet A*. 2009;149A:1200-1204.
64. Fernández BA, Roberts W, Chung B, Weksberg R, Meyn S, Szatmari P, Joseph-George AM, Mackay S, Whitten K, Noble B, Vardy C, Crosbie V, Luscombe S, Tucker E, Turner L, Marshall CR, Scherer SW. Phenotypic spectrum associated with de novo and inherited deletions and duplications at 16p11.2 in individuals ascertained for diagnosis of autism spectrum disorder. *J Med Genet*. 2010;47:195-203.
65. Marangi G, Leuzzi V, Orteschi D, Grimaldi ME, Lecce R, Neri G, Zollino M. Duplication of the Rubinstein-Taybi region on 16p13.3 is associated with a distinctive phenotype. *Am J Med Genet A*. 2008;146A:2313-2317.
66. Bruno DL, Anderlid BM, Lindstrand A, Van Ravenswaaij-Arts C, Ganesamoorthy D, Lundin J, Martin CL, Douglas J, Nowak C, Adam MP, Kooy RF, Van der Aa N, Reyniers E, Vandeweyer G, Stolte-Dijkstra I, Dijkhuizen T, Yeung A, Delatycki M, Borgström B, Thelin L, Cardoso C, Van Bon B, Pfundt R, De Vries BB, Wallin A, Amor DJ, James PA, Slater HR, Schoumans J. Further molecular and clinical delineation of co-locating 17p13.3 microdeletions and microduplications that show distinctive phenotypes. *J Med Genet*. 2010;47:299-2311.
67. Shimojima K, Sugiura C, Takahashi H, Ikegami M, Takahashi Y, Ohno K, Matsuo M, Saito K, Yamamoto T. Genomic copy number variations at 17p13.3 and epileptogenesis. *Epilepsy Res*. 2010;89:303-309.
68. Mefford HC, Clauin S, Sharp AJ, Moller RS, Ullmann R, Kapur R, Pinkel D, Cooper GM, Ventura M, Ropers HH, Tommerup N, Eichler EE, Bellanne-Chantelot C. Recurrent reciprocal genomic rearrangements of 17q12 are associated with renal disease, diabetes, and epilepsy. *Am J Hum Genet*. 2007;81:1057-1069.
69. Nagamani SC, Erez A, Shen J, Li C, Roeder E, Cox S, Karaviti L, Pearson M, Kang SH, Sahoo T, Lalani SR, Stankiewicz P, Sutton VR, Cheung SW. Clinical spectrum associated with recurrent genomic rearrangements in chromosome 17q12. *Eur J Hum Genet*. 2010;18:278-284.
70. Dubourg C, Sanlaville D, Doco-Fenzy M, Le Caignec C, Missirian C, Jaillard S, Schluth-Bolard C, Landais E, Boute O, Philip N, Toutain A, David A, Edery P, Moncla A, Martin-Coignard D, Vincent-Delorme C, Mortemousque I, Duban-Bedu B, Drunat S, Beri M, Mosser J, Odent S, David V, Andrieux J. Clinical and molecular characterization of 17q21.31 microdeletion syndrome in 14 French patients with mental retardation. *Eur J Med Genet*. 2011;54:144-151.
71. Andrieux J, Lepretre F, Cuisset JM, Goldenberg A, Delobel B, Manouvrier-Hanu S, Holder-Espinasse M. Deletion 18q21.2q21.32 involving TCF4 in a boy diagnosed by CGH-array. *Eur J Med Genet*. 2008;51:172-177.
72. Kato Z, Morimoto W, Kimura T, Matsushima A, Kondo N. Interstitial deletion of 18q: comparative genomic hybridization array analysis of 46, XX,del(18)(q21.2.q21.33). *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2010;88:132-135.
73. Malan V, Raoul O, Firth HV, Royer G, Turleau C, Bernheim A, Willatt L, Munnich A, Vekemans M, Lyonnet S, Cormier-Daire V, Colleaux L. 19q13.11 deletion syndrome: a novel clinically recognisable genetic condition identified by array comparative genomic hybridisation. *J Med Genet*. 2009;46:635-640.

Screening for subtelomeric chromosome alteration in a consecutive series of newborns with congenital defects

Laura Rodríguez^a, María Luisa Martínez-Fernández^a, Elena Mansilla^a, Jacobo Mendioroz^a, Rosa María Arteaga^b, Joaquín Fernández Toral^c, Nieves Martínez Guardia^d, Angel García^e, Fernando Centeno^f, Jorge Pantoja^g, Carmen Jovani^g and María Luisa Martínez-Frías^{a,h}

It is generally accepted that 2.5% of the patients with unexplained mental retardation and dysmorphic features have a chromosome alteration affecting the subtelomeric regions. The frequency of such alterations whether in the general population or in newborns with congenital defects, however, remains unknown. Here, we present an analysis of the subtelomeric regions in a consecutive series of 71 newborn babies with congenital defects, who displayed a normal high resolution G-band karyotype (550–850 bands). After excluding the alterations that could be considered to be polymorphisms, a total of seven subtelomeric anomalies were observed with a frequency of 9.86% (3.96–20.31). We conclude that fluorescence in-situ hybridization screening for subtelomeric alterations is relevant for infants with congenital defects detectable at birth, particularly in those newborn babies with congenital defects and a normal high resolution G-band karyotype.

Clin Dysmorphol 17:5–12 © 2008 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins.

Clinical Dysmorphology 2008, 17:5–12

Keywords: congenital defects, fluorescence in-situ hybridization, newborn babies, subtelomeric rearrangement, telomeres

^aSpanish Collaborative Study of Congenital Malformations (ECEMC), Research Center of Congenital Anomalies (CIAC), Carlos III Health Institute, Ministry of Health and Consumer Affairs, ^bNeurology Service, Hospital Marqués de Valdecilla, Cantabria, ^cPediatric Service, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, ^dNeonatology Service, Hospital Severo Ochoa, ^ePediatric Service, Hospital General del Insalud de Guadalajara, Guadalajara, ^fPediatric Service, Hospital del Río Hortega, Valladolid, ^gPediatric Service, Hospital de la Plana, Vila-Real, Castellón, Spain and ^hPharmacology Department, Medicine Faculty, Complutense University, Madrid

Correspondence to Dr Laura Rodríguez, CIAC, Instituto de Salud Carlos III, Sinesio Delgado 6, Pabellón 6, 28029, Madrid, Spain
E-mail: laura@isciii.es

Received 2 February 2007 Accepted 9 July 2007

Introduction

The telomeres are responsible for chromosome stability and for preventing cells from undergoing apoptosis and entering into senescence. The distal parts of the telomeres are composed of complex families of repetitive DNA that are more or less common to all chromosomes, whereas, the proximal DNA is a 'unique sequence' or a 'subtelomeric sequence' that is specific to each chromosome (Knight and Flint, 2000). These 'unique sequences' are gene-rich regions that must remain integral; indeed, the clinical repercussions caused by their disruption is even greater than that generated by other similar size interstitial imbalances (Saccone *et al.*, 1992).

Different molecular techniques have been used to study the 'critical' subtelomeric chromosome regions in patients with dysmorphic features and different degrees of unexplained mental retardation (MR); these include the following: comparative genomic hybridization (CGH); analysis of microsatellite markers; quantitative PCR; multiplex ligation-dependent probe amplification, fluorescence in-situ hybridization (FISH), and dysmorphic features (Flint *et al.*, 1995; Pinkel *et al.*, 1998; Knight *et al.*, 1999; Ballif *et al.*, 2000; Knight and Flint, 2000; Colleaux

et al., 2001; De Vries *et al.*, 2001; Joly *et al.*, 2001; Joyce *et al.*, 2001; Riegel *et al.*, 2001; Anderlid *et al.*, 2002; Biesecker, 2002; Baker *et al.*, 2002; Clarkson *et al.*, 2002; Dawson *et al.*, 2002; Martin *et al.*, 2002; Rio *et al.*, 2002; Yakut *et al.*, 2002; Vissers *et al.*, 2003; De Vries *et al.*, 2003; Koolen *et al.*, 2004; Roberts *et al.*, 2004; Rodriguez-Revenga *et al.*, 2004; Shaw-Smith *et al.*, 2004; Walter *et al.*, 2004; Adeyinka *et al.*, 2005; Moog *et al.*, 2005; Schoumans *et al.*, 2005; Sogaard *et al.*, 2005; Wong *et al.*, 2005; Miyake *et al.*, 2006; Ravnan *et al.*, 2006; Rooms *et al.*, 2006; Rosenberg *et al.*, 2006). In fact, it is accepted that about 3% of patients with unexplained MR will have a subtelomeric chromosome alteration, although 0.5% of these can be considered to be polymorphisms that are unrelated with phenotypic manifestations (Jalal and Ketterling, 2004; Hengstschlager *et al.*, 2005; Ravnan *et al.*, 2006).

In addition to the individuals with dysmorphic features and MR and couples with recurrent miscarriages (Fan and Zhang, 2002; Yakut *et al.*, 2002; Cockwell *et al.*, 2003; Alkuraya *et al.*, 2006), we have only found a prenatal (Gignac *et al.*, 2006) and a postnatal study (Caignec *et al.*, 2005), in which fetuses with multiple congenital

Clinical Report

The New Wolf–Hirschhorn Syndrome Critical Region (WHSCR-2): A Description of a Second Case

Laura Rodríguez,^{1*} Marcella Zollino,² Salvador Climent,³ Elena Mansilla,¹ Fermina López-Grondona,¹ María Luisa Martínez-Fernández,¹ Marina Murolo,² and María Luisa Martínez-Frías⁴

¹Estudio Colaborativo Español de Malformaciones Congénitas (ECEMC) del Centro de Investigación sobre Anomalías Congénitas (CIAC), Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid, Spain

²Istituto di Genetica Medica, Università Católica Sacro Cuore, Rome, Italy

³Departamento de Pediatría del Hospital de Ontinyent, Valencia, Spain

⁴Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid, Spain

The Wolf–Hirschhorn syndrome (WHS), is a well known contiguous gene syndrome characterized by microcephaly, hypertelorism, prominent glabella, epicanthal folds, cleft lip or palate, cardiac defects, growth and mental retardation and seizures. The currently accepted WHS critical region (WHSCR) is localized between the loci D4S166 and D4S3327, where a deletion seems to generate all the clinical manifestations of the syndrome. Here we present a patient with a subtelomeric deletion of 4p16.3 showing growth and psychomotor delay with a typical WHS facial appearance and two episodes of seizures in conjunction with fever. The high-resolution G-banded karyotype was normal. Fluorescence in situ hybridization (FISH) with a set of cosmid from 4p16.3, showed that the deletion in this patient was from the D4S3327 to the telomere, enabling the size of the deletion to be estimated as 1.9 Mb, excluding the accepted WHSCR deletion. This patient supports the recent proposal by Zollino et al. [2003] that the critical region for WHS is located distally to the WHSCR between the loci D4S3327 and D4S98-D4S16, and it is called “WHSCR-2” [Zollino et al., 2003].

© 2005 Wiley-Liss, Inc.

KEY WORDS: Wolf–Hirschhorn syndrome; 4p subtelomeric deletion; FISH; 4p16.3; WHSCR; WHSCR-2

INTRODUCTION

Wolf–Hirschhorn syndrome (WHS) has been considered a contiguous gene syndrome with a critical region within 4p16.3. In 1997, Wright et al. through an overlapping deletion analysis concluded that the WHS critical region (WHSCR) was localized

in a 165 kb interval at 4p16.3 band, between loci D4S166 and D4S3327.

At the region 4p16.3 two genes mapping within the WHSCR, called *WHSC1* and *WHSC2*, have been identified as candidates for the clinical manifestation of the WHS [Stec et al., 1998; Wright et al., 1999]. Another gene (*LETM1*), located just distal and outside of the WHSCR has been described as an excellent candidate gene for seizures [Endele et al., 1999]. Here we present a patient with a 1.9 Mb subtelomeric deletion on 4p16.3 excluding the initially described for WHSCR.

CLINICAL REPORT

The child was a 4-year-old girl, who was born after 34 gestational weeks by caesarean section because of intrauterine growth retardation (IUGR) (Patient 97). She was the product of the first pregnancy of a 22-year-old mother and a 29-year-old father, both healthy and non consanguineous. At birth she had a weight of 1,400 g (below the 3rd centile), a length of 38.5 cm (below the 3rd centile), and an OFC of 28 cm (below the 3rd centile). The renal sonogram showed a bilateral pyelectasia. The echocardiogram was normal. She also had hypotonia, and the cerebral CT scan, cerebral sonogram, and spine X-rays were normal.

At age 2 years, she could not walk and showed psychomotor delay of a mild degree. She had suffered three episodes of febrile seizures treated with valproic acid. Her weight (6,400 g) and length (74 cm) remained below the 3rd centile.

At 3 years of age weight was 8,340 g (−3.5 SD), length 82 cm (−3 SD), and OFC 45 cm (−3 SD). Thus head circumference was proportionate to the length.

At age 4 years, she was referred to us for clinical and cytogenetic analyses without karyotype. At that time, height, weight, and head circumference was still below the 3rd centile. The physical examination showed frontal bossing, long nose with prominent nasal bridge and wide columella, short philtrum with everted upper lip, mild epicanthic fold with convergent strabismus in the left eye, and slightly posteriorly rotated ears with smooth helices (Fig. 1). The hair was thin but otherwise normal. A sacral dimple, decreased subcutaneous tissue, four congenital epithelial nevi, one in the base of the neck and three in the thorax, were noted. External genitalia were normal for a female. Her bone age was 2 years delayed. She can now speak only monosyllabic words, understand simple commands, and walks unsupported.

CYTOGENETIC RESULTS

White blood cells from the patient were analyzed by high-resolution G-banded chromosomes (850 bands), showing an apparently normal karyotype. Fluorescence in situ hybridization (FISH) analyses with the Multiprobe-T kit (Cytocell)

Grant sponsor: Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS), Instituto de Salud Carlos III. Ministerio de Sanidad y Consumo (Spain); Grant number: PI020028; Grant sponsor: Cofin 2003-MIUR (MZ); Grant number: GGP030253; Grant sponsor: Telethon.

*Correspondence to: Laura Rodríguez, CIAC, Instituto de Salud Carlos III, Sinesio Delgado 6, Pabellón 6, 28029 Madrid, Spain. E-mail: laura@isciii.es

Received 24 November 2004; Accepted 17 March 2005

DOI 10.1002/ajmg.a.30775

Haploinsufficiency of *BMP4* Gene May be the Underlying Cause of Frías Syndrome

María Luisa Martínez-Fernández,^{1,2} Eva Bermejo-Sánchez,^{1,2,3} Belén Fernández,⁴ Alexandra MacDonald,² Joaquín Fernández-Toral,⁵ and María Luisa Martínez-Frías^{1,2,6*}

¹CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER) (U724), Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad, Madrid, Spain

²Spanish Collaborative Study of Congenital Malformations (ECEMC), CIAC (Research Center on Congenital Anomalies), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

³Instituto de Investigación de Enfermedades Raras (IIER), Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad, Madrid, Spain

⁴Servicio de Neonatología, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo (Asturias), Spain

⁵Servicio de Genética, Hospital Universitario Central de Asturias, Facultad de Medicina, Universidad de Oviedo, Oviedo (Asturias), Spain

⁶Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

Manuscript Received: 8 April 2013; Manuscript Accepted: 7 August 2013

In 2005, we reported on a family as having Frías syndrome (OMIM: 609640), with four affected members displaying a pattern of congenital defects nearly identical to those observed in a mother and son described by Frías [Frías et al. (1975). *Birth Defects Orig Artic Ser* 11:30–33]. These defects included growth deficiency, facial anomalies, and hand and foot alterations. We had the opportunity to study this family again due to the birth of another affected girl, who presented with similar facial characteristics to those of her elder half-sister and the rest of affected relatives, which consisted of mild exophthalmia, bilateral palpebral ptosis, downslanting palpebral fissures, and hypertelorism. We performed array-CGH, which identified an identical interstitial deletion of chromosome 14q22.1–q22.3 in the mother and two daughters. The deletion is 4.06 Mb in length and includes the *BMP4* gene, a member of the bone morphogenetic protein (BMP) family of secreted proteins. A review of the literature showed that deletions or mutations of this gene underlie congenital defects affecting brain, eye, teeth, and digit development. Although the clinical manifestations of the current family correlate with the defects observed in patients having either 14q22–q23 deletions or mutations of *BMP4*, they show a milder phenotype. In order to understand the clinical variability, we evaluated the already known functional characteristics of the *BMP* gene members. This gene family plays an important role during early embryogenesis, and the complex synergistic functions and redundancies of the BMPs led us to conclude that haploinsufficiency of *BMP4* is likely to be responsible for the clinical expression of Frías syndrome.

© 2013 Wiley Periodicals, Inc.

Key words: microdeletion syndrome; del 14q22.1–q22.3; Frías syndrome; *BMP4* gene

How to Cite this Article:

Martínez-Fernández ML, Bermejo-Sánchez E, Fernández B, MacDonald A, Fernández-Toral J, Martínez-Frías ML. 2013. Haploinsufficiency of *BMP4* Gene may be the underlying cause of Frías syndrome. *Am J Med Genet Part A* 9999:1–8.

INTRODUCTION

In 2005, we reported on [Martínez-Frías et al., 2005] a family as having Frías syndrome (OMIM: 609640), in which the four affected members had a pattern of congenital defects nearly identical to those observed in a previous family (a mother and son) described by Frías et al. [1975]. This syndrome is characterized by the presence of mild exophthalmia, palpebral ptosis, hypertelorism, quite short and square hands with minimal proximal syndactyly between second and third fingers, small broad big toes and short stature. In addition, the proband of the second family presented with

Grant sponsor: Instituto de Salud Carlos III (ISCIII, Ministry of Economy and Competitiveness) of Spain, and the Consejería de Sanidad del Gobierno del Principado de Asturias. Spain. CIBERER is an initiative of ISCIII.

*Correspondence to:

María Luisa Martínez-Frías, Centro de Investigación Anomalías Congénitas (CIAC), Instituto de Salud Carlos III, Avda. Monforte de Lemos, 5. Pab. 3, 28029 Madrid, Spain. E-mail: mlmartinez.frias@isciii.es

Article first published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com): 00 Month 2013

DOI 10.1002/ajmg.a.36224

Delineation of the Clinically Recognizable 17q22 Contiguous Gene Deletion Syndrome in a Patient Carrying the Smallest Microdeletion Known to Date

María Luisa Martínez-Fernández,^{1,2} Joaquín Fernández-Toral,³ Isabel Llano-Rivas,⁴ Eva Bermejo-Sánchez,^{1,2,5} Alexandra MacDonald,² and María Luisa Martínez-Frías^{1,2,6*}

¹Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad, Madrid, Spain

²Centro de Investigación sobre Anomalías Congénitas (CIAC), Estudio Colaborativo Español de Malformaciones Congénitas (ECEMC), Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad, Madrid, Spain

³Departamento de Genética, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Asturias, Spain

⁴Servicio de Genética, Biocruces Health Research Institute, Hospital Universitario Cruces, Barakaldo, Spain

⁵Instituto de Investigación de Enfermedades Raras, Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad, Madrid, Spain

⁶Dpto. Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid, Spain

Manuscript Received: 5 January 2015; Manuscript Accepted: 2 April 2015

We describe a patient with a 1.34 Mb microdeletion at chromosome band 17q22, which is also present in his affected mother. To better delineate this microdeletion syndrome, we compare the clinical and molecular characteristics of 10 previously reported cases and our patient. Of these, the present patient has the smallest deletion which includes five genes: *MMD*, *TMEM100*, *PCTP*, *ANKFN1*, and *NOG*. We compare the clinical manifestations described in relation to *NOG*, since this is the only gene whose loss is shared by our patient and the other eight patients. Previously, the clinical patterns associated with *NOG* mutations have been included under the general term “*NOG*-related symphalangism spectrum disorder (*NOG*-SSD).” Based on our analyses, and considering that there is a clinical correlation observed in cases with a “17q22 microdeletion including *NOG*” of which the main characteristics can be contributed to loss of this gene, we propose that the clinical patterns observed in these patients should be named as *NOG*-spectrum disorder-contiguous gene syndrome (*NOGSD*-CGS). This designation is important for clinicians because when a patient has defects concordant with alterations of *NOG* but also presents other anomalies not related to this gene, they would be able to suspect the existence of a microdeletion affecting 17q22, therefore, allowing an early diagnosis. This will also enable the clinician to provide the family with adequate information about the prognosis and the risk of reoccurrence in future potential offspring.

© 2015 Wiley Periodicals, Inc.

Key words: 17q22 contiguous gene syndrome; 17q22; microdeletion; *NOG* gene; *NOGSD*-CGS

How to Cite this Article:

Martínez-Fernández ML, Fernández-Toral J, Llano-Rivas I, Bermejo-Sánchez E, MacDonald A, Martínez-Frías ML. 2015. Delineation of the clinically recognizable 17q22 contiguous gene deletion syndrome in a patient carrying the smallest microdeletion known to date. *Am J Med Genet Part A* 167A:2034–2041.

INTRODUCTION

Recently, Laurell et al. [2013] described a new clinically recognizable 17q22 contiguous microdeletion syndrome. This is one of three microdeletions in the chromosome 17q21–q24 region. The other two microdeletions affect chromosome bands 17q21.31 (OMIM#610443); and 17q23.1–q23.2 (OMIM#613355). Laurell et al. [2013] considered the need for descriptions of additional patients with microdeletions at 17q22, in order to elucidate the

Conflict of interest: The authors have no conflict of interest to declare.

*Correspondence to:

Prof. Dr. María Luisa Martínez-Frías, ECEMC Director, Research Center on Congenital Anomalies (CIAC), Instituto de Salud Carlos III, Av. Monforte de Lemos, 5. Pab. 3, 1st floor, Madrid 28029, Spain.

E-mail: mlmartinez.frias@isciii.es

Article first published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com): 21 April 2015

DOI 10.1002/ajmg.a.37117

A Highly Specific Coding System for Structural Chromosomal Alterations

M.L. Martínez-Frías^{1,2,3*} and M.L. Martínez-Fernández^{1,3}

¹ECEMC, Centro de Investigación sobre Anomalías Congénitas (CIAC), Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad, Madrid, Spain

²Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

³Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Madrid, Spain

Manuscript Received: 26 July 2012; Manuscript Accepted: 30 October 2012

The Spanish Collaborative Study of Congenital Malformations (ECEMC, from the name in Spanish) has developed a very simple and highly specific coding system for structural chromosomal alterations. Such a coding system would be of value at present due to the dramatic increase in the diagnosis of submicroscopic chromosomal deletions and duplications through molecular techniques. In summary, our new coding system allows the characterization of: (a) the type of structural anomaly; (b) the chromosome affected; (c) if the alteration affects the short or/and the long arm, and (d) if it is a non-pure dicentric, a non-pure isochromosome, or if it affects several chromosomes. We show the distribution of 276 newborn patients with these types of chromosomal alterations using their corresponding codes according to our system. We consider that our approach may be useful not only for other registries, but also for laboratories performing these studies to store their results on case series. Therefore, the aim of this article is to describe this coding system and to offer the opportunity for this coding to be applied by others. Moreover, as this is a SYSTEM, rather than a fixed code, it can be implemented with the necessary modifications to include the specific objectives of each program. © 2013 Wiley Periodicals, Inc.

Key words: coding system; chromosomal deletions; duplications; submicroscopic alterations; structural; code

INTRODUCTION

There are many registries of congenital defects all over the world with different designs and methodologies [ICBDSR; EUROCAT], and all of them need a coding system for the different types of developmental alterations. Generally, the coding used in these registries is the International Classification of Diseases (ICD) from the World Health Organization (WHO), with or without the British Pediatric Association (BPA) extension, depending on the registry. However, as our knowledge has progressed this coding system has been evolving in order to also increase its specificity. Moreover, the current version that is used in the great majority of congenital defect registries is the ICD-9, which has already been changed to the next version, ICD-10, which is evolving to become

How to Cite this Article:

Martínez-Frías ML, Martínez-Fernández ML. 2013. A highly specific coding system for structural chromosomal alterations. *Am J Med Genet Part A* 161A:732–736.

the ICD-10 plus. However, to the best of our knowledge, none of these registries has a coding system with enough specificity to codify each type of structural chromosome alterations. Needless to say, that a specific coding system allows proper retrieval of cases in order to carry out our research on homogeneous groups of cases, resulting in a better use of resources.

Such a coding system would be of great value at present due to the dramatic increase in the diagnosis of submicroscopic chromosomal deletions and duplications, due to the use of molecular technologies. Having such a specific system may facilitate an accurate analysis of each type of alteration, aimed at investigating the characteristics of patients with the same submicroscopic anomalies, as well as the correlation between the genes involved in the altered genomic regions and the patients' phenotypes.

The Spanish Collaborative Study of Congenital Malformations (ECEMC, from the name in Spanish), which has significant experience in chromosomal analysis as well as in dysmorphology and coding of congenital anomalies [Martínez-Frías, 1994; Martínez-Frías and Urioste, 1994], has developed a simple and highly specific coding system for structural chromosomal alterations. Our new coding system allows the characterization of: (a) the type of structural anomaly; (b) the chromosome affected; (c) if the alter-

The authors declare no conflict of interest.

*Correspondence to:

Prof. Dr. M.L. Martínez-Frías, Facultad de Medicina, Director Centro de Investigación Anomalías Congénitas (CIAC), Instituto de Salud Carlos III, Avda. Monforte de Lemos, 5. Pabellón 3-1ª planta, Madrid 28029, Spain. E-mail: mlmartinez.frias@isciii.es

Article first published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com): 12 March 2013

DOI 10.1002/ajmg.a.35787

DISCUSIÓN

4.- DISCUSION

El nacimiento de un niño con defectos congénitos implica la necesidad de establecer un diagnóstico por varios motivos. En primer lugar, porque dar un “nombre” al problema que presenta el recién nacido indica que ya se conoce y, que por tanto, se puede tener información sobre las implicaciones que suponen el conjunto de sus defectos y así establecer una atención médica adecuada y, sobre todo, anticipatoria. En segundo lugar, porque implica también saber las potenciales causas, lo que permite determinar el riesgo de repetición familiar o su inexistencia. Y por último, porque se podrá ofrecer una completa información a la familia, lo que disminuirá la angustia que suelen tener los padres cuando no saben lo que tiene su hijo.

Entre las causas conocidas de los defectos congénitos, las alteraciones cromosómicas han sido las más frecuentes y para las que más fácil ha resultado su confirmación diagnóstica, sobre todo las alteraciones que afectan al número de los cromosomas. Sin embargo, como ya se ha comentado anteriormente, la probabilidad de detección de las alteraciones estructurales, depende del tamaño de la alteración y de la capacidad de detección de las técnicas disponibles en cada momento. En cariotipos con cromosomas de alta resolución (550-850 bandas), se detectan alteraciones estructurales a partir de 4 ó 5 megabases.

Existen gran cantidad de publicaciones sobre todos los tipos de alteraciones estructurales, referidas a uno o varios cromosomas, incluyendo las producidas *de novo* o derivadas de alteraciones balanceadas de origen parental. En algunos trabajos se han estudiado los tipos de anomalías cromosómicas y sus frecuencias en series de pacientes de distintas procedencias, así como en casos de diagnóstico prenatal [Park et al 2001, Cerrillo et al 2009], o de revisiones de la literatura [Kim et al 1999, Bateman et al 2010]. Sin embargo, no hemos encontrado ninguna publicación que analizara una muestra de recién nacidos consecutivos con defectos congénitos (mayores y/o menores) identificados al nacimiento, para calcular la frecuencia de los diferentes tipos de alteraciones identificadas en cada cromosoma y sus potenciales diferencias.

El primer trabajo que presento en esta memoria para obtener el grado de doctor [Martínez-Fernández et al., 2011], muestra los resultados obtenidos en el laboratorio del ECEMC, de estudios citogenéticos realizados en el periodo comprendido entre 1981 y 2009, a los recién nacidos con defectos congénitos que integran la base de datos del ECEMC. Este trabajo está publicado en el Boletín del ECEMC: Revista de Dismorfología y Epidemiología (ISSN: 0210-3893), que es una revista científica anual, en la que se recogen los principales resultados de la investigación del ECEMC y es de libre acceso: <http://revistas.isciii.es/revistas.jsp?id=ECEMC>

El objetivo del trabajo era analizar la frecuencia de alteraciones cromosómicas estructurales no balanceadas en cada cromosoma, con especial atención a las pérdidas y ganancias como única alteración del cariotipo (las llamadas alteraciones “puras”) y comprobar cómo ha impactado las técnicas de FISH en el diagnóstico de las malformaciones congénitas.

De un total de 4.681 pacientes estudiados en todo el periodo, el 32,64% (1.528) presentó una alteración cromosómica. Como era de esperar las alteraciones numéricas fueron las más frecuentes con un 83,38%, mientras que las estructurales se detectaron en 241 niños (15,77%). Clasificamos un tercer grupo muy pequeño que incluía 13 casos (0,85%) que presentaban a la vez una alteración numérica y una estructural (por ejemplo una trisomía 21 y una translocación balanceada, respectivamente).

De las alteraciones estructurales, las deleciones (42,55% de los casos) fueron 2,1 veces más frecuentes que las duplicaciones (20,22%) y las deleciones de los brazos cortos eran 3 veces más frecuentes que las duplicaciones. Entre los casos detectados por técnicas de FISH, como era de esperar, las deleciones fueron 15.49 veces más frecuentes que las duplicaciones, siendo la microdelección 22q11.2 la más común (38,46 %), seguido por las deleciones en los cromosomas 15 (15,38%) y 4 (10,26%).

El laboratorio del ECEMC se puso en marcha en el año 1981 y se realizaban cariotipos convencionales de moderada resolución. A partir del año 95 se incorporaron

técnicas de FISH por lo que se pudieron detectar mayor número de alteraciones estructurales. Para comprobar este hecho, separamos el periodo estudiado en dos: uno comprendido entre los años 1981-1994, en los que sólo se realizaban análisis de citogenética y otro, el 1995-2009, en el que ya se usaban también técnicas de FISH. Como era de esperar, las diferencias entre los dos periodos, eran estadísticamente significativas, con una mayor frecuencia de detección de alteraciones estructurales cuando se utilizan técnicas de FISH, fundamentalmente debido a los síndromes de microdelección.

Gracias al desarrollo de las técnicas moleculares, el avance de la citogenética ha sido espectacular. La técnica de FISH (y más recientemente los arrayCGH) no sólo ha permitido identificar síndromes de microdelección si no que ha podido estudiar zonas concretas de los cromosomas. Se ha visto que en las partes más distales contienen zonas ricas en genes. Los telómeros son regiones situadas en los extremos de los cromosomas y son responsables de la estabilidad cromosómica. Previenen a las células de la apoptosis y de entrar en senescencia. Las partes distales de los telómeros están compuestos por ADN repetitivo que es común en todos los cromosomas. Próximo a ellos existe una secuencia única, específica de cada cromosoma que se denomina secuencia subtelomérica [Knight y Flint, 2000]. Estas secuencias únicas son regiones ricas en genes y se ha visto que las alteraciones afectando a estas zonas, tienen una gran repercusión clínica. De hecho, en el 2,5% de los pacientes con discapacidad intelectual de origen no filiado y malformaciones congénitas, se han detectado alteraciones de estas regiones [Ravnan et al., 2006]. Por esta razón, en el laboratorio del ECEMC, estudiamos las regiones subteloméricas mediante FISH o MLPA a recién nacidos con múltiples defectos congénitos detectados en los tres primeros días de vida, y cuyo cariotipo no hubiese mostrado ninguna alteración. Este estudio lo publicamos en el año 2008 en la revista *Clinical Dysmorphology*, que es el segundo artículo que incluyo en esta memoria [Rodríguez et al 2008]

El análisis de las regiones subteloméricas de todos los cromosomas se realizó a 71 recién nacidos con defectos congénitos, con cariotipo normal y sin una sospecha clínica clara de ningún síndrome conocido. El resultado fue que el 9,86% presentó una alteración subtelomérica de uno o varios cromosomas, que justificaba los defectos

congénitos del niño. Para comprobar el origen *de novo* o parental, se realizó el estudio a los progenitores y se identificó que 4 de las 7 alteraciones eran de origen parental. Este hecho pone de manifiesto la importancia de identificar una alteración cromosómica en un recién nacido con defectos congénitos, y su posterior estudio en los progenitores puesto que se proporciona un buen asesoramiento genético para futuras gestaciones de la pareja. De los resultados que obtuvimos, 2 pacientes tenían una delección en el brazo corto del cromosoma 1 y otro en el brazo corto del cromosoma 4. Ambas alteraciones son de síndromes clínicamente reconocibles pero debido a su gran variabilidad clínica y al hecho de que algunas de sus características clínicas aparecen a lo largo de los años, no siempre es posible sospechar estos síndromes al nacimiento.

Hasta la fecha era el único trabajo sobre regiones subteloméricas diagnosticadas en una serie consecutiva de recién nacidos, puesto que las publicaciones que existían, se basaban en muestras de pacientes seleccionadas, de distintas edades y de diferente procedencia.

La gran mayoría de las alteraciones del desarrollo embrionario y fetal individualmente tienen frecuencias muy, muy bajas, por lo que son paradigma de las enfermedades raras (ER). Por ello, es muy importante la cooperación y colaboración entre los investigadores de esta área para acumular un número suficiente de pacientes para su estudio, como ocurre en el tercer trabajo que presento.

Los síndromes de microdelección o de genes contiguos son un grupo de desórdenes clínicamente reconocibles caracterizados por una microdelección (< 5Mb) de un cromosoma que abarca múltiples genes, y cuya haploinsuficiencia contribuye de manera independiente al fenotipo. Se han establecidos regiones mínimas de delección que producen un síndrome en concreto, que es la llamada región crítica. Estas microdelecciones no son detectables mediante cariotipos convencionales o de alta resolución sino que se requiere de la aplicación de técnicas de citogenética molecular como la técnica de FISH.

En el caso del síndrome de Wolf-Hirschhorn (WHS, su siglas en inglés), Wright et al [1997] identificó la región crítica para el síndrome (WHSCR) en un intervalo de 165Kb en el cromosoma 4 en la banda p16.3, a una distancia del telómero de 2,2Mb, que incluía los genes: *WHSC1* y *WHSC2* que se habían propuesto como necesarios para producir el síndrome y que debían de estar incluidos en la región crítica. La determinación de esta región crítica permitió comercializar la sonda de FISH y así se pudo diagnosticar pacientes con deleciones más pequeñas y cuyos cromosomas 4 eran aparentemente normales en el cariotipo. Estas deleciones producían los rasgos clínicos clásicos del síndrome pero no las malformaciones más graves y el retraso mental era de menor grado.

En el año 2003, Zollino et al., propuso dos formas clínicas del síndrome, dependiendo de la gravedad: una clásica y otra forma leve. En ese trabajo describió un paciente con una forma leve del síndrome que presentaba una deleción de 1,9Mb, que no incluía la región crítica. Previamente otros autores, habían descrito otros dos pacientes con formas leves sin deleción de la región crítica, por lo que Zollino et al., propuso una nueva región: WHSCR-2, más telomérica y próxima a la anterior región, que no incluía al gen *WHSC2*.

En el laboratorio del ECEMC, estudiamos a una niña con rasgos fenotípicos leves de WHS que presentó una deleción *de novo* de la región subtelomérica 4p que no incluía la WHSCR. En colaboración con el grupo de investigación de la Dra. Marcella Zollino en Italia, pudimos determinar con exactitud el tamaño de la deleción. Como se puede ver en la Figura 8, tenía el mismo tamaño que el paciente descrito previamente por Zollino et al y tampoco incluía el gen *WHSC2*.

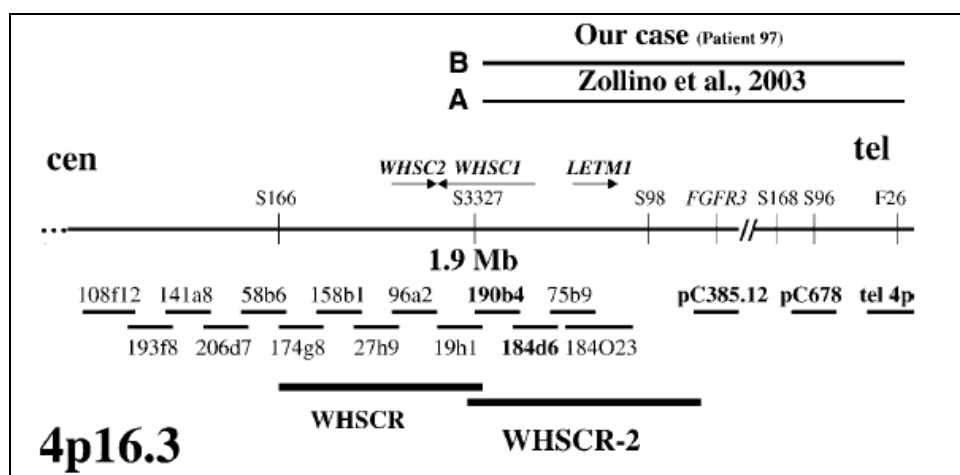


Figura 8. Esquema de la región 4p16.3 con los casos reportados de Zollino *et al*(2003) y nuestro paciente.

Con la aportación de nuestro paciente, reforzamos la propuesta de Zollino *et al* [2003] de considerar la región crítica WHSCR-2, como la región mínima que se debe de delecionar para producir el síndrome de Wolf-Hirschhorn.

Hasta ahora hemos hablado de cómo las técnicas de FISH nos han ayudado a diagnosticar niños con defectos congénitos cuyo cariotipo no mostraba ninguna alteración. En los últimos años, otra técnica molecular está proporcionando un gran impacto en el diagnóstico clínico. Es la hibridación genómica comparada (array CGH) que detecta pérdidas o ganancias de material genómico con una altísima resolución. Esta técnica ha permitido identificar la causa en un gran número de pacientes con alteraciones del neurodesarrollo y/o malformaciones congénitas. En el siguiente artículo que aportó a esta memoria [Martínez-Fernández *et al.*, 2013], propusimos la haploinsuficiencia de un gen como causa del síndrome Frías, en una familia que años atrás habíamos descrito clínicamente [Martínez-Frías *et al.*, 2005]. Este síndrome se caracterizaba por exoftalmia leve, ptosis palpebral, hipertelorismo, manos cortas y cuadradas con mínima sindactilia proximal entre el 2º y 3º dedos, dedos de los pies pequeños y anchos y estatura corta.

Con el nacimiento de un segundo hijo afectado de la familia que habíamos descrito tuvimos la oportunidad de realizar un array CGH que detectó una delección de

4,06Mb en 14q22.1q22.3. Esta deleción también estaba presente en la progenitora y en la hermana (Figura 9), que tenían además rasgos clínicos parecidos.

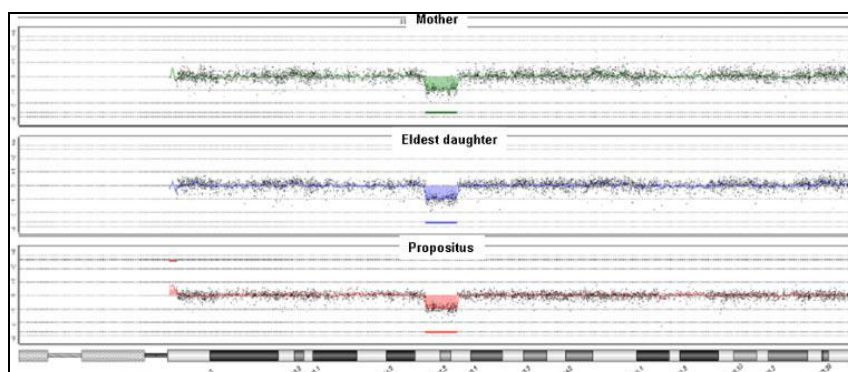


Figura 9. Imagen de la deleción del cromosoma 14 en los arrayCGH de la madre y las dos hijas.

La deleción incluía 20 genes OMIM, de los cuales destaca el gen *BMP4* (*Bone Morphogenic Protein 4*) por su papel en la inducción del mesodermo, en el desarrollo de los dientes, en la formación de las extremidades, la inducción ósea y en la reparación ósea por fractura. Las características funcionales de los genes *BMP* han demostrado que son importantes mediadores en la inducción en diferentes tejidos, donde se coexpresan, tienen diferentes interacciones, activan vías comunes y pueden compensarse funcionalmente.

Se han descrito pacientes con deleciones en 14q22-q23, de diferentes tamaños y con gran variabilidad clínica. Para poder hacer una correlación genotipo-fenotipo, comparamos los pacientes publicados que especificaban el tamaño exacto de la deleción o hablaban de los genes delecionados. Como se puede observar en la Figura 10, varios de los pacientes tenían deleciones más grandes e incluían dos genes *OTX2* y *SIX6*, que se asocian a alteraciones oculares (anoftalmia y microftalmia).

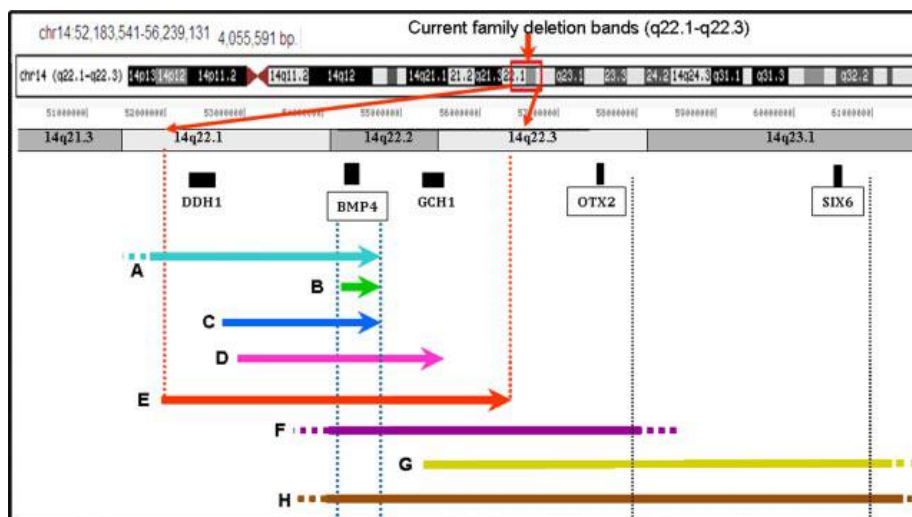


Figura 10. Deleciones descritas en 14q22q23. (A: Lumaka et al., 2012; B: Reis et al., 2011; C: Reis et al., 2011; D: Hayashi et al., 2008; E: familia que describimos; F y G: Bakrania et al., 2008; H: Bennett et al., 1991; Lemyre et al., 1998.)

Además Bakrania et al., [2008] estudio la expresión de *BMP4* y determinó que se expresaba en el cerebro, en los ojos, pituitaria y dedos. En un estudio de pacientes con alteraciones oculares, identificó mutaciones de *BMP4* y concluyó que se trata de un gen implicado en las malformaciones oculares asociado con poli-sindactilia, así como con anomalías del cerebro.

Al comparar todos los casos, vimos la gran variabilidad que existe en las deleciones de 14q22q23 y la diferente gravedad de los defectos, que probablemente va a estar influido por la edad de los pacientes en el momento de la publicación o por el detalle con el que se realizan las descripciones clínicas, y por la habilidad y experiencia de los profesionales que realizan la exploración y descripción de los pacientes.

Nuestra conclusión fue proponer al gen *BMP4* como el mejor gen candidato del síndrome de Frías, puesto que su haploinsuficiencia se había demostrado que ocasionaba problemas oculares, defectos en la erupción dental, manos cortas y poli-sindactilia, características clínicas que estaban presentes en la familia que describimos.

Como ya se ha comentado, la acumulación de pacientes en el campo de la investigación de los defectos congénitos es un hecho muy importante puesto que al ser muy poco frecuentes, existen poco casos para poder estudiarlos. La publicación de pacientes con alteraciones cromosómicas similares permite correlacionar los genes y el fenotipo. Gracias a las técnicas moleculares están surgiendo nuevos síndromes de microdelección y están determinando la causa genética de muchos síndromes que hasta ahora solo tenían un diagnóstico clínico. Un ejemplo de ello es el siguiente artículo que presento [Martínez-Fernández et al. 2015].

Se trata de un paciente que al nacimiento se identificó: blefarofimosis, ptosis palpebral, nariz aguileña, hipoplasia de alas nasales, microstomía, microretrognatia, clinodactilia del 5º dedo de ambas manos, testículos y pene pequeños, hipoacusia congénita bilateral, sinostosis radiocubital (fusión del radio y del cúbito), anomalías vertebrales y rigidez generalizada de las articulaciones. Como se puede ver en la Figura 11, la madre y otros familiares tenían también limitaciones articulares y sordera.

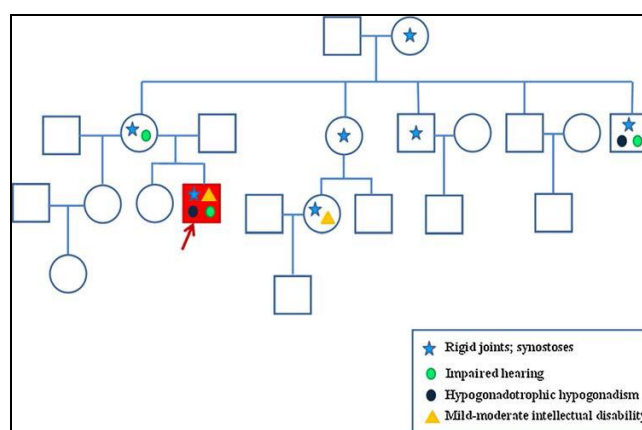


Figura 11. Árbol genealógico de la familia.

El diagnóstico clínico que le realizamos en el ECEMC en el año 1998 fue de Síndrome de sinfalangismo-braquidactilia y sordera (OMIM #186500), con un patrón de transmisión autosómico dominante cuya causa aún no estaba descrita.

Durante los primeros años de vida del paciente, los rasgos dismórficos se fueron haciendo más evidentes y tuvo múltiples sinostosis de vértebras cervicales y

lumbares, sinfalangismo del 5º dedo de ambas manos, cifosis dorso-lumbar e hipoplasia bilateral de la epífisis femoral. A los 15 años tenía incontinencia urinaria y encopresis, y se le diagnosticó de hipogonadismo-hipogonadotropo.

Recientemente pudimos realizar el estudio genómico del niño y de los progenitores mediante array CGH, que identificó una microdelección intersticial de 1,34Mb en un cromosoma 17, tanto en el paciente (Figura 12) como en su madre.

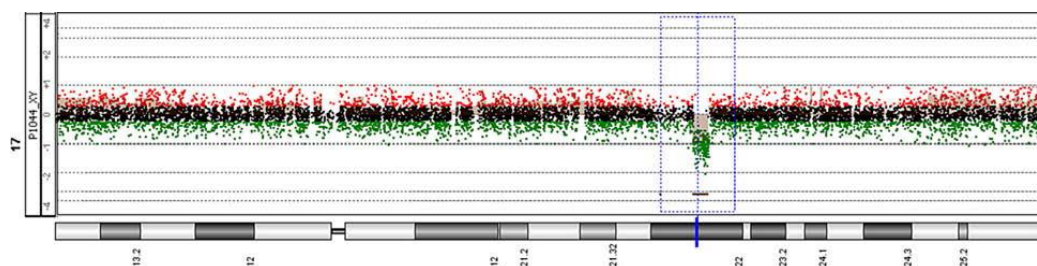


Figura 12. Imagen de array CGH del cromosoma 17 del paciente en la se puede observar una delección en la banda q22.

La delección solo contenía 5 genes: *MMD*, *TMEM100*, *PCTP*, *ANKFN1* y *NOG*, que están definidos en la Figura 13.

Genes	Definition and function
<i>MMD</i> [OMIM#604467]	Macrophage maturation-associated transcript encoding a protein with several potential transmembrane domains.
<i>TMEM100</i>	Plays a role during embryonic arterial endothelium differentiation and vascular morphogenesis through the ACVRL1 receptor-dependent signaling pathway upon stimulation by bone morphogenetic proteins, such as GDF2/BMP9 and BMP10 [By similarity].
<i>PCTP</i> [OMIM# 606055]	Phosphatidylcholine transfer protein (PCTP). Highest expression in liver, placenta, testis, kidney, and heart. Low levels in brain and lung. No expression detected in thymus.
<i>ANKFN1</i>	Homo sapiens ankyrin-repeat and fibronectin type III domain containing 1 [ANKFN1]. <i>ANKFN1</i> has been involved in the determination of human height [Lettre et al., 2008; Wood et al., 2014], and was identified in a genomic study of general vulnerability to substance use disorders [Johnson et al., 2009].
<i>NOG</i> [OMIM#602991]	Noggin. Essential for cartilage morphogenesis and joint formation. Inhibitor of bone morphogenetic proteins (BMP) signaling which is required for growth and patterning.

Figura 13. Funciones de los genes incluidos en la delección 17q22

Laurell et al había publicado recientemente, en el año 2013, 9 pacientes (4 eran de otros autores) con delecciones en 17q22 de diferentes tamaños (de 1,86 Mb a 8,18Mb) que afectaban a distintos genes y proponía un nuevo síndrome de microdelección. Comparamos las delecciones que describía con la de nuestro paciente y pudimos comprobar que en este último era la más pequeña descrita hasta el momento (Figura 14).

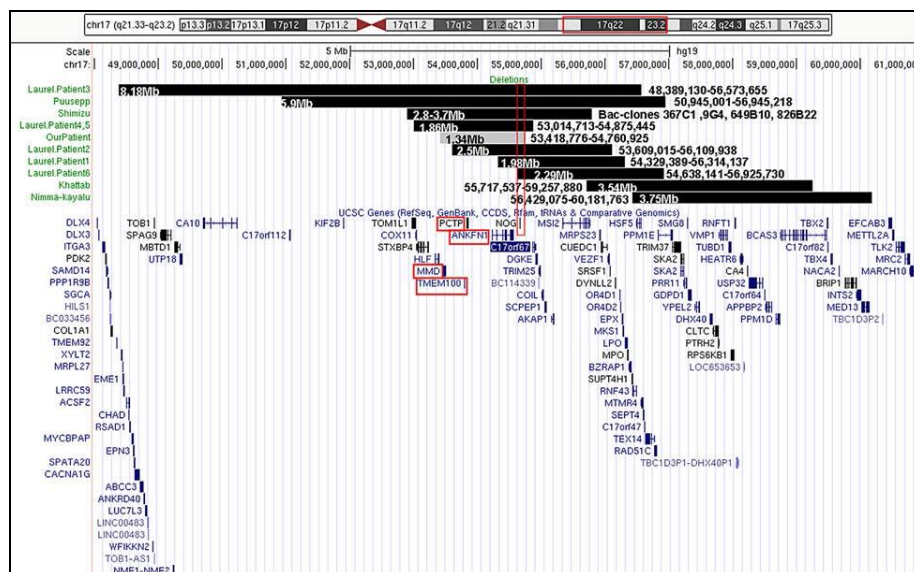


Figura 14. Deleciones descritas en Laurell et al 2013, incluyendo la deleción de nuestro paciente

Además, Laurell et al. [2013], delimitó una región común de deleción entre las deleciones descritas (dos pacientes no compartían esta región) y que incluía solo los genes: *NOG*, *C17orf67* y *ANKFN1* (rectángulo rojo, Figura 14). Si incluimos la deleción de nuestro paciente en esa región, se reduciría a los genes *NOG* y *ANKFN1*, excluyendo el *C17orf67*.

El gen *NOG* es un gen pequeño de un único exón (696bp). Produce la proteína Noggin que se une a BMPs (Bone Morphogenetic proteins) y participa en la formación de cartílago y de las articulaciones. Se han descrito mutaciones en *NOG* asociadas a 5 síndromes distintos:

- Sinfalangismo (fusión de falanges) proximal (SYM1, MIM#185800)
- Sinostosis múltiple 1 (SYNS1, MIM #186500)
- Anquilosis del estribo con pulgar y dedo gordo del pie anchos (MIM #184460)
- Braquidactilia tipo B2 (BDB, MIM#611377)
- Coalición tarso-carpiana (TCC, MIM #186570)

Todos estos síndromes están englobados en el llamado “espectro de alteraciones de sinfalangismo relacionadas con NOG” [Potti et al, 2011]. Teniendo en cuenta el efecto de las mutaciones, se puede considerar que las deleciones incluyendo *NOG*, van a producir también alteraciones fenotípicas, debidas al efecto de otros genes incluidos en la deleción.

Gracias a la publicación de este nuevo paciente apoyamos la idea de Laurell *et al.* de la existencia de un nuevo síndrome de microdeleción y además propusimos que la deleción del gen *NOG* debería llamarse: “espectro de alteraciones del NOG-Síndrome de genes contiguos” (NOG-Spectrum Disorder-Contiguous Gene Syndrome (NSD-CGS)).

La aplicación de las nuevas técnicas moleculares han incrementado la identificación, y seguirá incrementando, el número de alteraciones génicas. El registro de pacientes del ECEMC tiene un sistema de codificación para cada uno de los defectos o datos de la historia clínica de cada paciente. Sin embargo, no existían códigos específicos para cada tipo de alteración cromosómica estructural. Esto supuso que diseñáramos un código altamente específico que nos permitiese definir cada alteración cromosómica estructural: por cromosoma, por brazo cromosómico, por origen...etc. Este diseño lo realicé junto con la Dra ML Martínez-Frías, para la elaboración de esta tesis y dado su utilidad, fue publicado [Martínez-Frías y Martínez-Fernández, 2013]. Como se puede ver en la publicación, se trataba de un código alfa numérico para cada tipo de alteración estructural. Para ello teníamos ya asignado el número 7595, para los tipos de alteraciones estructurales pero sin mucha especificidad. Lo que hicimos fue añadir varios dígitos como se indica en la Figura 15 que especifica cada alteración. Los dígitos añadidos consistían en una letra para cada una de las alteraciones, el número de cromosoma con un 6º dígito, que es también una letra (el cromosoma 1 era la A, el cromosoma 2 el B y así sucesivamente) y con el 7º dígito, que es numérico y que indica el brazo cromosómico, u otras características.

The first four digits numeric [7595] CODE These indicate structural chromosome alterations IN GENERAL	Fifth digit is a capital letter This digit indicates the TYPE of alteration	Sixth digit is a capital letter This digit identifies the CHROMOSOME	Seventh digit is numeric Identifies the chromosome ARM[s], and many OTHER characteristics
Code and letter	Fifth digit: type of alteration	Sixth digit (Letter): chromosome	Seventh digit: several characteristics
7595-	Structural chromosomal alterations		
A-	Pure isochromosome	A—1	1—p
B-	Pure dicentric chromosome	B—2	2—q
C-	Terminal deletion	C—3	3—p + q
D-	Interstitial deletion	D—4	4—Dicentric
E-	Terminal duplication	E—5	5—Isochromosome
F-	Interstitial duplication	F—6	6—Several
G-	Inverted duplication and recombinant chromosomes from inversions	G—7	Chromosomes involved
H-	Ring chromosome	H—8	7—Ring chromosome
I-	Chromosome fragility, Nijmegen type	I—9	Z—Not specified
J-	Extra derivative chromosome resulting from a parental translocation	J—10	
K-	Derivative chromosome resulting from parental alteration (with 46 chromosomes)	K—11	
L-	Derivative chromosome resulting from a de novo translocation or other alteration	L—12	
M-	Insertions and derivative chromosomes	M—13	
N-	Balanced Robertsonian translocation	N—14	
O-	Imbalanced Robertsonian translocation	O—15	
P-	Balanced de novo reciprocal translocation	P—16	
Q-	Imbalanced de novo reciprocal translocation	Q—17	
R-	Mosaics of different number of chromosomes and in which one of the cell-lines has [an] structural alteration[s]	R—18	
S-	Mosaics of different number of chromosomes and different structural alterations	S—19	
T-	Extra marker chromosome with structural alteration, of parental origin	T—20	
U-	Extra chromosome (marker or other) with a de novo structural alteration (cat-eye or similar)	U—21	
V-	Extra chromosome (mosaic/homogeneous)	V—22	
W-	Mosaic with the same number of chromosomes and different alterations (either in one cell-line or all)		
X-	—	X—X	
Y-	—	Y—Y	
Z-	Structural chromosomal alterations not specified (NS)	Z—NS	

NS, non-specified.

NS, non-specified.

Figura 15. Sistema de codificación de las alteraciones cromosómicas estructurales

Para ver cómo sería en un ejemplo la delección 17q22 descrita en la publicación que he comentado anteriormente se codificaría como: 7595DQ2, puesto que la delección era intersticial (Letra D), del cromosoma 17 (Letra Q) y del brazo largo (Número 2).

De esta forma quedaban englobadas y bien tipificadas las alteraciones estructurales que teníamos en el ECEMC y nos preparamos ya, al futuro incremento de las alteraciones que detectan las técnicas moleculares.

CONCLUSIONES

5.- CONCLUSIONES

1. Las alteraciones cromosómicas constituyen la principal causa conocida de los defectos congénitos. En cuanto a sus tipos, las numéricas son más frecuentes que las estructurales. En el ECEMC, de un total de 4.681 estudios citogenéticos, el 32,64% (1.528) presentó una alteración cromosómica, y de éste el 83,38% eran alteraciones numéricas y el 15,77% estructurales. Clasificamos un tercer grupo muy pequeño que incluía 13 pacientes (0,85%) que presentaban a la vez una alteración numérica y una estructural (por ejemplo una trisomía 21 y una translocación balanceada, respectivamente).
2. De las alteraciones estructurales detectadas mediante cariotipo de alta resolución, las deleciones (42,55% de los casos) fueron 2,1 veces más frecuentes que las duplicaciones (20,22%) y las deleciones de los brazos cortos son 3 veces más frecuentes que las duplicaciones. Entre los casos detectados por técnicas de FISH, como era de esperar, las deleciones fueron 15,49 veces más frecuentes que las duplicaciones, siendo la microdelección 22q11.2 la más común (38,46 %), seguido por las deleciones en los cromosomas 15 (15,38%) y 4 (10,26%).
3. El análisis de las regiones subteloméricas de todos los cromosomas a recién nacidos con defectos congénitos con cariotipo normal es muy ventajoso puesto que se detectan alteraciones menores de 5Mb que pueden explicar la causa de sus defectos. En un estudio a 71 recién nacidos registrados en el ECEMC obtuvimos un 9,86% de alteración subtelomérica de uno o varios cromosomas. Hasta la fecha de publicación (2008) era el único trabajo sobre regiones subteloméricas diagnosticadas en una serie consecutiva de recién nacidos no seleccionada.
4. El estudio mediante técnicas de FISH de un paciente con rasgos clínicos de síndrome de Wolf-Hirschhorn, nos permitió identificar una delección de 1,9Mb del cromosoma 4p16.3, que no incluía la región crítica (WHSCR) previamente descrita. Se trataba de una delección de la región propuesta por Zollino et al

[2003], WHSCR-2, que reforzó la idea de considerar esta región como la región mínima que se debe de delecionar para producir el síndrome de Wolf-Hirschhorn.

5. Hemos propuesto al gen *BMP4* como el mejor gen candidato que produce el síndrome Frías, puesto que su haploinsuficiencia se ha demostrado que ocasiona problemas oculares, defectos en la erupción dental, manos cortas y poli-sindactilia, características clínicas que estaban presentes en una familia que años atrás habíamos descrito clínicamente [Martínez-Frías et al., 2005].
6. Hemos identificado la microdelección intersticial más pequeña en 17q22 hasta ahora descrita, que contiene 5 genes: *MMD*, *TMEM100*, *PCTP*, *ANKFN1* y *NOG* de los cuales en el gen *NOG* se han descrito mutaciones asociadas a 5 síndromes distintos: que están englobados en el llamado “espectro de alteraciones de sinfalangismo relacionadas con *NOG*”. Para los pacientes que tengan delección, propusimos denominar el “espectro de alteraciones del *NOG*-Síndrome de genes contiguos”. Y, además, con nuestro caso apoyamos la propuesta de Laurell et al. en 2013 de la existencia de un nuevo síndrome de microdelección en 17q22.
7. Dadas las posibilidades de la estructura del registro del ECEMC, no solo se pueden formar grupos homogéneos de pacientes con relación a diferentes características, como hemos hecho con los niños afectados por alteraciones cromosómicas estructurales, si no que se ha podido crear un sistema de codificación altamente específico, para cada uno de los tipos de alteraciones estructurales. Con este código, somos capaces de hacer estudios sobre el tipo de cromosoma, tipo de alteración y su distribución en niños con defectos congénitos.

SUMMARY

6.- SUMMARY

Title: CLINICAL AND EPIDEMIOLOGICAL STUDY OF STRUCTURAL CHROMOSOMAL ALTERATIONS AS A CAUSE OF HUMAN BIRTH DEFECTS

Introduction: It has been established that about 2-3% of newborns present congenital defects of any kind. However, if the period of detection of birth defects is extended until the first few years of life, the proportion of children affected reaches 6-7% or more. These frequencies represent the population (or basal) risk for humans; that is, the risk for each pregnancy that the child will present alterations of prenatal development. However, the health impact of birth defects varies between countries according to their economic and social situation. Thus, it is well documented that in developed countries congenital defects are the leading cause of infant mortality and morbidity.

Among the known causes of birth defects, chromosomal abnormalities form the largest group, of which alterations that affect the number of chromosomes (numerical) are the most common. The other type of chromosome anomaly is structural, but can be more difficult to detect depending on the size of the alteration and the detection capability of the techniques available. High-resolution chromosome analysis (550-850 bands) can detect structural alterations involving as little as 4 megabases (Mb) of DNA. However, the spectacular development of molecular cytogenetics, especially comparative genomic hybridization (CGH), is producing an exponential increase in the identification of much smaller structural alterations. CGH allows the detection of losses or gains of genomic material with a very high resolution, and has identified the genetic cause in a large number of patients with neurodevelopmental disorders and/or congenital malformations

The data used for this work is from the registry of newborns with congenital anomalies from the network of the Spanish Collaborative Study of Congenital Malformation (ECEMC, from its initials in Spanish). ECEMC is a hospital-based, case-controlled study and surveillance system, with the aim of surveying congenital

anomalies in order to establish their frequencies, investigate their characteristics and determine their causes.

Objectives

1. Investigate the genetic cause of congenital defects in a consecutive series (not selected) of newborn infants.
2. Ascertain the most frequent structural chromosome alterations in a large sample of consecutive newborns with congenital defects of any kind, identified during the past 30 years (from when the ECEMC laboratory started).
3. Establish homogeneous groups of patients who have the same structural chromosomal alterations.
4. Genotype-phenotype correlation in patients with the same structural chromosome alterations.
5. Transfer the results of this birth defect research into clinical practice.

Results and Discussion: The results of this study are shown in this PhD dissertation with six publications. We have estimated the frequency of unbalanced structural chromosomal alterations identified in the consecutive series of newborn infants with congenital defects, detected at birth or during the first three days of life, and registered in the Spanish Collaborative Study of Congenital Malformations (ECEMC). These cases, which span the time period 1981 to 2009, underwent cytogenetic analysis at the ECEMC laboratory. A total of 4,681 cases were studied following a protocol established by the ECEMC program, which starts by performing high-resolution chromosome analysis (550-850 bands), and further studies with FISH and/or MLPA if required. Deletions affecting the chromosome short arms (p) were 3 times more frequent than short-arm duplications. Among the cases detected by FISH techniques, deletions were 15.49 times more frequent than duplications, the 22q11.2 microdeletion being the most common (38.46% of cases), followed by deletions of chromosomes 15 (15.38%) and 4 (10.26%). To our knowledge, this study represents the first that analyses the frequency of all chromosome alterations, as well as chromosome-specific, in a consecutive series of newborn infants with congenital defects.

The development of molecular techniques has allowed for a deeper knowledge of chromosome structure. The distal parts of the telomeres are composed of complex clusters of repetitive DNA that are common to all chromosomes, whereas the proximal DNA has a 'unique sequence' or a 'subtelomeric sequence' that is specific to each chromosome. These 'unique sequences' are gene-rich regions that must remain integral; in fact, the clinical repercussions caused by their disruption is even greater than that generated by other similar size interstitial imbalances. It is generally accepted that 2.5% of patients with unexplained intellectual disability and dysmorphic features have a chromosome alteration affecting the subtelomeric regions. We analysed subtelomeric regions in a consecutive series of 71 newborn babies with congenital defects and a normal high-resolution karyotype (550–850 bands). A total of seven subtelomeric anomalies were observed with a frequency of 9.86%.

Microdeletion syndromes, or contiguous gene syndromes, are a group of clinically recognisable disorders characterised by the loss of genetic material generally not cytogenetically visible (<5Mb), involving multiple genes whose haploinsufficiency contributes independently to the phenotype. The Wolf–Hirschhorn syndrome (WHS) is a well known contiguous gene syndrome characterised by microcephaly, hypertelorism, prominent glabella, epicanthal folds, cleft lip or palate, cardiac defects, growth and developmental delay and seizures. The currently accepted critical region (WHSCR) is localised in chromosome 4p16.3, where a deletion seems to generate all the clinical manifestations of the syndrome. In 2005 we published, in collaboration with Dr. Zollino from Italy, a patient with a subtelomeric deletion of 4p16.3, estimated to be 1.9 Mb in size, but excluding the accepted WHSCR deletion. This patient supports the proposal by Zollino et al. [2003] that the true critical region for WHS is actually located distally to the WHSCR, and has since been named WHSCR-2.

Recently, another molecular technique that is causing a major impact on clinical diagnosis is Comparative Genomic Hybridisation (CGH), which detects gains or losses of genomic material with a very high resolution. This technique has identified the cause of a large number of patients with neurodevelopmental disorders and/or birth defects. We proposed the haploinsufficiency of the *BMP4* gene to be responsible for Frias

syndrome in a family that we described clinically years ago. We then went in to evaluate the already known functional characteristics of the *BMP* gene members. This gene family plays an important role during early embryogenesis, and the complex synergistic functions and redundancies of the BMPs led us to conclude that haploinsufficiency of *BMP4* is likely to be the cause of the clinical expression of Frías syndrome.

We also described the first reported patient with the 17q22 contiguous microdeletion syndrome, since its recent identification by Laurell et al. [2013], which also allowed further delineation of the phenotype assigned to this region.

Finally, we developed a very simple and highly specific coding system for structural chromosomal alterations. Such a coding system is of great value at present due to the dramatic increase in the diagnosis of submicroscopic chromosomal deletions and duplications through molecular techniques.

BIBLIOGRAFÍA

7.- BIBLIOGRAFÍA

- Arrighi FE, Hsu TC. Localization of heterochromatin in human chromosomes. 1971. *Cytogenetics*. 10(2):81-6.
- Bakrania P, Efthymiou M, Klein JC, Salt A, Bunyan DJ, Wyatt A, Ponting CP, Martin A, Williams S, Lindley V, Gilmore J, Restori M, Robson AG, Neveu MM, Holder GE, Collin JR, Robinson DO, Farndon P, Johansen-Berg H, Gerrelli D, Ragge NK. Mutations in BMP4 cause eye, brain, and digit developmental anomalies: Overlap between the BMP4 and hedgehog signaling pathways. *Am J Hum Genet*. 2008. 82:304–319.
- Bateman MS, Mehta SG, Willatt L, Selkirk E, Bedwell C, Zwolinski S, Sparnon L, Simonic I, Abbott K, Barber JC. A de novo 4q34 interstitial deletion of at least 9.3 Mb with no discernible phenotypic effect. *Am J Med Genet A*. 2010;152A:1764-1769.
- Bennett CP, Betts DR, Seller MJ. Deletion 14(q22–q23) associated with anophthalmia, absent pituitary, and other abnormalities. *J Med Genet*. 1991. 28:280–281.
- Caspersson T, Farber S, Foley GE, Kudynowski J, Modest EJ, Simonsson E, Wagh U, Zech L. Chemical differentiation along metaphase chromosomes. *Exp Cell Res* 1970; 49: 219-222.
- Cerrillo Hinojosa M, Yerena de Vega MC, Gonzalez Panzzi ME, Godoy H, Galicia J, Gutierrez Najar A. Genetic amniocentesis in high-risk populations. Experience in 3081 cases. *Ginecol Obstet Mex*. 2009;77:173-182.
- Currall BB, Chiang C, Talkowski ME, Morton CC. Mechanisms for Structural Variation in the Human Genome. *Curr Genet Med Rep*. 2013 Jun 1;1(2):81-90.
- Dutrillaux B, Lejeune J (1971). Sur une nouvelle technique d'analyse du caryotype humain. *C. R. Acad. Sci. (Paris)* 272 : 2638-2640.
- Girirajan S, Campbell CD, Eichler EE (2011). Human copy number variation and complex genetic disease. *Annu Rev Genet*. 2011;45:203-26.
- Hayashi S, Okamoto N, Makita Y, Hata A, Imoto I, Inazawa J. Heterozygous deletion at 14q22.1–q22.3 including the BMP4 gene in a patient with

- psychomotor retardation, congenital corneal opacity and feet polysyndactyly. *Am J Med Genet A*. 2008. 146:2905–2910.
- Hirschhorn, K., Cooper, H. L., Firschein, I. L. Deletion of short arms of chromosome 4-5 in a child with defects of midline fusion. *Humangenetik* 1965. 1: 479-482.
 - Iafrate AJ, Feuk L, Rivera MN, Listewnik ML, Donahoe PK, Qi Y, Scherer SW, Lee C. Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat Genet*. 2004 Sep;36(9):949-51. Epub 2004 Aug 1.
 - Kallioniemi A ,Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*.1992;258: 818–21.
 - Kim SS, Jung SC, Kim HJ, Moon HR, Lee JS. Chromosome abnormalities in a referred population for suspected chromosomal aberrations: a report of 4117 cases. *J Korean Med Sci*. 1999;14:373-376.
 - Knight and Flint. Perfect endings: a review of subtelomeric probes and their use in clinical diagnosis. *J Med Genet*. 2000. Jun;37(6):401-9.
 - Laurell T, Lundin J, Anderlid BM, Gorski JL, Grigelioniene G, Knight SJ, Krepischi AC, Nordenskjöld A, Price SM, Rosenberg C, Turnpenny PD, Vianna-Morgante AM, Nordgren A. Molecular and clinical delineation of the 17q22 microdeletion phenotype. *Eur J Hum Genet*. 2013 Oct;21(10):1085-92.
 - Lejeune J, Lafourcade J, Berger R, Vialatte J, Boeswillwald M, Seringe P, Turpin R. Trois cas de deletion partielle du bras court d'un chromosome 5. [3 cases of partial deletion of the short arm of a 5 chromosome]. *C R Hebd Seances Acad Sci*. 1963 Nov 18;257:3098-102.
 - Lemyre E, Lemieux N, De'carie JC, Lambert M. Del (14)(q22.23q23.2) in a patient with anophthalmia and pituitary hypoplasia. *Am J Med Genet*. 1998. 77:162–165.
 - Lumaka A, Van Hole C, Casteels I, Ortibus E, De Wolf V, Vermeesch JR, Lukusa T, Devriendt K. Variability in expression of a familial 2.79Mb microdeletion in chromosome 14q22.1-22.2. *AmJ Med Genet A*. 2012 158A:1381–1387.

- **Martínez-Fernández ML**, Bermejo-Sánchez E, Fernández B, Macdonald A, Fernández-Toral J, Martínez-Frías ML. Haploinsufficiency of BMP4 gene may be the underlying cause of Frías syndrome. *Am J Med Genet A*. 2014 Feb;164A(2):338-45.
- **Martínez-Fernández ML**, Fernández-Toral J, Llano-Rivas I, Bermejo-Sánchez E, Martínez-Frías ML. Delineation of the clinically recognizable 17q22 contiguous gene deletion syndrome in a patient carrying the smallest microdeletion known to date. *Am J Med Genet A*. 2015 Apr 21. doi: 10.1002/ajmg.a.37117.
- **Martínez-Fernández ML**, MacDonald A, Aceña I, Bermejo-Sánchez E, Grupo Periférico del ECEMC, Martínez-Frías ML. Análisis de alteraciones cromosómicas estructurales y su distribución por cromosoma en la serie de recién nacidos con defectos congénitos del ECEMC. *Bol ECEMC: Rev Dismor Epidemiol. Serie VI, Nº 1*. Ed. ML Martínez-Frías. CIAC, Instituto de Salud Carlos III. Madrid, 2011.
- Martínez-Frías ML, Cuevas L, Grupo Periférico del ECEMC, Bermejo-Sánchez E. Análisis clínico-epidemiológico de los recién nacidos con defectos congénitos registrados en el ECEMC: Distribución por etiología y por grupos étnicos *Bol ECEMC: Rev Dismor Epidemiol; Serie VI, Nº2*. Ed. ML Martínez-Frías. CIAC, Instituto de Salud Carlos III. Madrid, 2012. (ISSN 0210-3893).
- Martínez-Frías ML, Martínez-Fernández ML. A highly specific coding system for the different structural chromosomal alterations. *Am J Med Genet Part A* 2013 Apr, 161A:732–736.
- Martínez-Frías ML, Toral JF, López-Grondona F, Mendioroz J, Bermejo E. Growth deficiency, facial anomalies, and brachydactyly (Frías syndrome): a second family. *Am J Med Genet A*. 2005 Sep 1;137A(3):288-91.
- Martínez-Frías ML. Manual operacional del ECEMC. 2003. Ed. Martínez-Frías y Bermejo. ISSN 0210-3893.
- Matsui S, Sasaki M. Differential staining of nucleolus organisers in mammalian chromosomes. *Nature*. 1973 Nov 16;246(5429):148-50.
- Misawa S, Horiike S, Taniwaki M, Abe T, Takino T. Prefixation treatment with ethidium bromide for high resolution banding analysis of chromosomes from

- cultured human bone marrow cells. *Cancer Genet Cytogenet.* 1986 Aug;22(4):319-29.
- Park SY, Kim JW, Kim YM, Kim JM, Lee MH, Lee BY, Han JY, Kim MY, Yang JH, Ryu HM. Frequencies of fetal chromosomal abnormalities at prenatal diagnosis: 10 years experiences in a single institution. *J Korean Med Sci.* 2001;16:290-293.
 - Pinkel D, Straume T, Gray JW. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986 May; 83(9):2934-8.
 - Potti TA, Petty EM, Lesperance MM. A comprehensive review of reported heritable noggin-associated syndromes and proposed clinical utility of one broadly inclusive diagnostic term: NOG-related-symphalangism spectrum disorder (NOG-SSD). *Hum Mutat.* 2011 Aug;32(8):877-86.
 - Ravnan JB, Tepperberg JH, Papenhausen P, Lamb AN, Hedrick J, Eash D, Ledbetter DH, Martin CL. Subtelomere FISH analysis of 11 688 cases: an evaluation of the frequency and pattern of subtelomere rearrangements in individuals with developmental disabilities. *J Med Genet.* 2006 Jun;43(6):478-89.
 - Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, Fiegler H, Shapero MH, Carson AR, Chen W, Cho EK, Dallaire S, Freeman JL, González JR, Gratacòs M, Huang J, Kalaitzopoulos D, Komura D, MacDonald JR, Marshall CR, Mei R, Montgomery L, Nishimura K, Okamura K, Shen F, Somerville MJ, Tchinda J, Valsesia A, Woodwark C, Yang F, Zhang J, Zerjal T, Zhang J, Armengol L, Conrad DF, Estivill X, Tyler-Smith C, Carter NP, Aburatani H, Lee C, Jones KW, Scherer SW, Hurles ME. Global variation in copy number in the human genome. *Nature.* 2006 Nov 23;444(7118):444-54.
 - Rodríguez L, **Martínez-Fernández ML**, Mansilla E, Mendioroz J, Arteaga RM, Toral FJ, Guardia NM, García A, Centeno F, Pantoja J, Jovani C, Martínez-Frías ML. Screening for subtelomeric chromosome alteration in a consecutive series of newborns with congenital defects. *Clin Dysmorphol.* 2008 Jan; 17(1):5-12.
 - Rodríguez L, Zollino M, Climent S, Mansilla E, López-Grondona F, **Martínez-Fernández ML**, Murdolo M, Martínez-Frías ML. The new Wolf-Hirschhorn

- syndrome critical region (WHSCR-2). A description of a second case. *Am J Med Genet A*. 2005 Jun 15; 136(2):175-8.
- Sánchez-Izquierdo MD, **Martínez-Fernández ML** y Martínez-Frías ML. ¿Qué son los microarrays? Aplicación al diagnóstico de anomalías congénitas. *Boletín del ECEMC: Revista de Dismorfología y Epidemiología*. 2010 Dic. Serie V, nº 9: 48-54.
 - Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwiijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res*. 2002; 30(12):e57.
 - Strømme P, Bjørnstad PG, Ramstad K. Prevalence estimation of Williams syndrome. *J Child Neurol*. 2002 Apr;17(4):269-71.
 - The 1000 Genomes Project Consortium, Abecasis GR, Altshuler D, Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Gibbs RA, Hurles ME, McVean GA. A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature*. 2010 Oct 28;467(7319):1061-73.
 - Wolf, U., Reinwein, H., Porsch, R., Schroter, R., Baitsch, H. Defizienz an den kurzen Armen eines Chromosoms Nr. 4. *Humangenetik* 1965. 1: 397-413.
 - Wright TJ, Ricke DO, Denison K, Abmayr S, Cotter PD, Hirschhorn K, Keinanen M, McDonald-McGinn D, Somer M, Spinner N, Yang-Feng TL, Zackay E, Altherr MR. A transcript map of the newly defined 165 Kb Wolf–Hirschhorn syndrome critical region. *Hum Mol Genet*. 1997. 6:317–324.
 - Yunis, J.J. High resolution of human chromosomes. *Science* 1976; 191: 1268-1270.
 - Zollino M, Lecce R, Fischetto R, Murdolo M, Faravelli F, Selicorni A, Butte C, Memo L, Capovilla G, Neri G. Mapping the Wolf–Hirschhorn syndrome phenotype outside the currently accepted WHS critical region and defining a new critical region, WHSCR-2. *Am J Hum Genet*. 2003. 72:590–597.